

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Recebido em 25/05/01
Feild

NEO UELAC

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

DISSEMINAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*
EM UMA LINHA DE PRODUÇÃO DE
"NUGGETS" CONGELADOS DE FRANGO

Cristiano Andrigheto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. **Maria Teresa Destro**

SÃO PAULO
2000

16.762

DEDALUS - Acervo - CQ



30100003794

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andrigheto, Cristiano
A573d Disseminação de *Listeria monocytogenes* em uma linha
de produção de “nuggets” congelados de frango / Cristiano
Andrigheto. -- São Paulo, 2000.
51p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental.

Orientador: Destro, Maria Teresa

1. Microbiologia de alimentos 2. Ciência dos alimentos
I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador.

664.07 CDD

Cristiano Andrigheto

**DISSEMINAÇÃO DE *Listeria monocytogenes*
EM UMA LINHA DE PRODUÇÃO DE
"NUGGETS" CONGELADOS DE FRANGO**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof. Assoc. Bernadette D. G. M. Franco
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Mariza Landgraf
1º Examinador

Prof. Dr. Márcia P. A. Mayer
2º Examinador

Maria Teresa Destro
Professor Doutor

São Paulo, 22 de dezembro de 2000

À Priscila

Aos meus pais, Diógenes e Cláucia, e
irmãos, Viviana e Gabriel

Agradecimentos

- À professora Dra. Maria Teresa Destro, pela orientação, pela amizade e pelo bom humor.
- Às professoras Dra. Bernadette D. G. M. Franco e Dra. Mariza Landgraf, pelo carinho com que me receberam e pelo apoio nestes anos.
- À colega Denize Aparecida Rodrigues, pela amizade, pelo fornecimento do material de trabalho e pelas dicas.
- Ao Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz (RJ), pelo fornecimento das cepas padrão de *Listeria*.
- À minha colega e companheira Priscila de Arruda Trindade, pela colaboração e apoio em todas as etapas do trabalho.
- Ao colega Luciano dos Santos Bersot, pela parceria, colaboração e troca de experiências.
- Aos professores Dr. João R. O. do Nascimento (FBA-FCF) e Dr. Anselmo S. Moriscot (ICB) e ao Glédson M. Guimarães (FBT-FCF), pela cooperação na realização deste trabalho.
- À professora Dra. Márcia P. A. Mayer, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda na interpretação dos resultados do RAPD.
- Aos professores Dr. José Paes de A. N. Pinto e Dra. Susana M. I. Saad, pela amizade e pelas sugestões.
- Às bibliotecárias Adriana de Almeida Barreiros e Leila Aparecida Bonadio, da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão das referências bibliográficas.

- Às funcionárias Kátia e Lúcia, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, convívio e pela ajuda em situações especiais.
- Aos colegas Evânia, Patrícia e Wladimir pela colaboração no laboratório e pela amizade.
- Às colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Alcina, Alexandra, Analí, Cláudia, Emilieme, Flávia I, Flávia II, Maria, Mariana, Paula I, Paula II e Viviane.
- À colega Katlin B. Massirer, pela amizade, pelo apoio e pela colaboração.
- Ao colega Nilton E. H. Lincopan, pela amizade, pela troca de experiências e pela colaboração em informática.
- Ao pessoal das Secretarias de FBA e de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Ângela, Isabel e Mônica; e Benedita, Elaine e Jorge.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado e financiamento do projeto.
- E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1. Origem das cepas.....	11
3.2. Tipagem por RAPD.....	12
3.2.1. Preparo das células de <i>Listeria</i> sp.....	12
3.2.2. Preparo do DNA de <i>E. coli</i>	17
3.2.3. PCR.....	17
3.2.4. Eletroforese.....	18
3.3. Tipagem sorológica	19
3.4. Análise dos resultados	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
5. CONCLUSÕES.....	43
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de produto (P). Adaptado de RODRIGUES (1999)..... 13
- Figura 2: Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de superfícies de equipamentos (S). Adaptado de RODRIGUES (1999)..... 14
- Figura 3: Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de ambiente (A) e de manipulador (M). Adaptado de RODRIGUES (1999)..... 15
- Figura 4: Representação esquemática do preparo das suspensões de células de *Listeria* para serem usadas na tipagem por RAPD.... 16
- Figura 5: Perfis RAPD obtidos com o "primer" M13 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli*..... 25
- Figura 6: Perfis RAPD obtidos com o "primer" UBC155 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli*..... 25

- Figura 7: Representação dos padrões de bandas dos perfis RAPD obtidos com o "primer" M13 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli*..... 26
- Figura 8: Representação dos padrões de bandas dos perfis RAPD obtidos com o "primer" UBC155 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli*..... 27
- Figura 9: Representação da relação genética entre os 50 perfis RAPD combinados obtidos para as cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A, *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli*..... 37

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1: Origem das 128 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas das amostras de produto (P) coletadas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango..... 21
- Tabela 2: Origem das 124 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas das amostras de ambiente (A), manipulador (M) e superfícies de equipamentos (S) coletadas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango..... 22
- Tabela 3: Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 17 perfis RAPD gerados com o "primer" M13..... 33
- Tabela 4: Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 23 perfis RAPD gerados com o "primer" UBC155..... 34
- Tabela 5: Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 50 perfis RAPD combinados obtidos com os "primers" M13 e UBC155..... 35
- Tabela 6: Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os sete subtipos formados pela combinação dos resultados da sorologia e do RAPD..... 38

Tabela 7: Distribuição dos sete subtipos de <i>L. monocytogenes</i> (A a G), obtidos pela combinação dos resultados da sorologia e do RAPD, nas diferentes etapas do processamento industrial de "nuggets" congelados de frango.....	39
---	----

RESUMO

A presente pesquisa teve por objetivo avaliar as fontes de contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma linha de processamento de "nuggets" congelados de frango. Linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes pontos de uma usina de processamento industrial nas diversas etapas do processamento foram avaliadas quanto à sua diversidade genética. A técnica empregada foi o RAPD com metodologia modificada da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO). Os perfis RAPD gerados com os "primers" M13 e UBC155 foram agrupados, combinados e analisados quanto à sua similaridade. As cepas foram também sorotipadas e 189 pertenciam ao sorogrupo 1 e 63 ao sorogrupo 4. A correlação entre a diversidade genética e a distribuição do microrganismo na linha de processamento foi estabelecida. As 252 *L. monocytogenes* estudadas puderam ser divididas em dois grandes "clusters" cada qual dividido em dois grupos. Os resultados da análise de "clusters" foram relacionados aos da sorologia, determinando sete subtipos. Verificou-se que três subtipos são introduzidos no ambiente de processamento juntamente com a matéria-prima. Um deles foi encontrado somente na matéria-prima e os outros dois também foram detectados em superfícies de equipamentos e no ambiente de processamento. Outros subtipos encontrados em superfícies de equipamentos e no ambiente foram encontrados no produto em etapas subseqüentes. A contaminação da matéria-prima por cepas diferentes daquelas encontradas no ambiente de processamento mostra a sua importância como fonte de contaminação. Formas de controle da presença de *L. monocytogenes* na matéria-prima devem ser buscadas assim como o controle da contaminação ambiente.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, "nuggets" de frango, RAPD, linha de processamento, tipagem molecular.

SUMMARY

This research was carried out in order to evaluate the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a frozen chicken nugget processing line. Strains of *L. monocytogenes* from different origins and isolated from different steps of the processing line were analysed for their genetic diversity. RAPD methodology modified from a WHO protocol was used. The RAPD profiles generated by primers UBC155 and M13 were grouped, combined and the similarities analysed. The strains were also serotyped and 189 belonged to serogroup 1 and 63 to serogroup 4. The correlation between genetic diversity and the strain distribution along the processing line was established. The 252 *L. monocytogenes* strains analysed were divided in two clusters, each of them containing 2 groups. Seven subtypes could be determined when the results of RAPD and serotyping were combined. It could be established that from the three sub-types of *L. monocytogenes* that belonged to the raw material, two could establish themselves in the processing line. These sub-types were detected latter in the environmental samples (food contact and non-food contact surfaces). On the other hand, other sub-types found initially in environmental samples were detected in the product in subsequent steps. The introduction of *L. monocytogenes* into the plant by raw material highlights its importance as a contamination source. Measures must be taken to control the presence of *L. monocytogenes* in the raw material as well as in the processing environment.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, chicken nuggets, RAPD, processing line, molecular typing.

1. INTRODUÇÃO

A importância de *Listeria monocytogenes* como causador de doenças em animais já é conhecida há muito tempo, e sua importância como patógeno humano, causador de doenças de origem alimentar reconhecida desde o início dos anos 80. *Listeria monocytogenes* é um microrganismo psicrotrófico ubíquo que pode contaminar os alimentos em qualquer etapa da cadeia alimentar. A listeriose é uma doença severa caracterizada por aborto, meningite e septicemia. A letalidade dos surtos ocorridos até o momento tem sido alta (20-30%), com a infecção acometendo principalmente mulheres grávidas, seus fetos e pacientes imunodeficientes. Devido à severidade e letalidade da doença e ao envolvimento de alimentos processados industrialmente, as consequências sociais e econômicas da listeriose são importantes, especialmente durante surtos (BILLE, ROUCOURT, 1996).

É interessante notar que as investigações epidemiológicas dos surtos têm demonstrado que o veículo destes surtos tem sido sempre algum alimento processado industrialmente, apesar de poder ter ocorrido contaminação cruzada em algum ponto da cadeia alimentar, não necessariamente na indústria (ROUCOURT, COSSART, 1997).

Com isto, as indústrias processadoras de alimentos foram alertadas para a importância de ocorrência deste microrganismo em seus produtos. A detecção de *Listeria monocytogenes* em uma usina processadora de alimentos é causa de preocupação, pois uma vez instalada a contaminação o microrganismo pode sobreviver por um período longo, principalmente se a temperatura ambiente for baixa e componentes do alimento propiciarem proteção ao mesmo (PALUMBO, WILLIAMS, 1990). *Listeria* tem ainda a capacidade de formar biofilmes, o que torna a sua remoção ainda mais difícil (MAFU et al., 1990).

Já foi observado em outros países (RYSER, MARTH, 1999) que as indústrias que rotineiramente pesquisam a presença de *Listeria*, e de outros microrganismos, em suas instalações e em produtos finais não transmitem estas informações à comunidade científica. Isto se deve, provavelmente ao temor da publicidade negativa e potencial perda financeira que poderiam resultar da divulgação destas informações. Com isto, o número de levantamentos publicados sobre a incidência de *Listeria* em instalações industriais é pequeno.

O emprego da amostragem ambiental e de produto ao longo da linha de processamento é uma forma de localizar áreas relacionadas à contaminação do alimento e revelar condições gerais do ambiente de processamento. Mas para melhor detectar as fontes de contaminação, as linhagens isoladas devem ser tipadas. A ligação epidemiológica entre as linhagens isoladas de uma linha de processamento permite que se determine com precisão os locais onde uma linhagem aparece ou desaparece, revelando as etapas que contribuem para a contaminação final do alimento (DODD, 1994).

Dentre os sistemas de tipagem, a sorologia apesar de muito empregada não apresenta suficiente poder discriminatório. *L. monocytogenes* apresenta 13 sorovares, todos patogênicos a humanos, mas são aqueles microrganismos pertencentes aos sorovares 1/2a, 1/2b e 4b os causadores da maior parte dos casos de listeriose humana ao redor do mundo (FARBER, PETERKIN, 1991; ROCOURT, COSSART, 1997). Assim, o sistema é útil para um primeiro agrupamento das cepas isoladas.

A maioria das cepas isoladas durante os surtos ocorridos nos anos 80 foi subtipada por combinação de sorotipagem e fagotipagem, os únicos métodos disponíveis àquela época. Mas, atualmente, uma vasta gama de métodos de tipagem molecular surgiu e tem sido utilizada por diversos pesquisadores de todo o mundo, incluindo eletroforese de enzima multilocus (MEE) e métodos que utilizam características genotípicas: análise de restrição de DNA (REA, RFLP), ribotipagem, eletroforese em gel de campo

pulsante (PFGE) e amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) (BILLE, ROUCOURT, 1996).

Com esses métodos foi possível melhorar a eficiência e a precisão da tipagem. Porém, somente em 1990 a Organização Mundial da Saúde (WHO, World Health Organization) iniciou um estudo multicentro visando a padronização dos diversos métodos fenotípicos e genotípicos de subtipagem de *L. monocytogenes*. Os resultados deste estudo foram publicados em uma edição especial do **International Journal of Food Microbiology** (BILLE, ROUCOURT, 1996; BROSCHE et al., 1996; CAUGANT et al., 1996; GERNER-SMIDT et al., 1996; MCLAUCHLIN et al., 1996; SCHÖNBERG et al., 1996; SWAMINATHAN et al. 1996; WERNARS et al., 1996).

O referido estudo visou avaliar critérios como reprodutibilidade intra- e interlaboratorial, além do poder discriminatório dos diversos métodos. Os resultados apontaram diferenças significativas entre a eficiência dos métodos de subtipagem e entre os resultados dos diferentes laboratórios usando um mesmo método. Isso se deu em parte devido à falta de padronização rigorosa, tanto do procedimento em si como da interpretação dos resultados. BILLE, ROUCOURT (1996), que participaram da organização do estudo, apontaram a necessidade de um segundo estudo com menos métodos, porém com melhor padronização. Concluíram ser este um procedimento de grande importância para que possa haver mais colaboração entre os laboratórios nacionais e internacionais envolvidos no estudo de *Listeria monocytogenes* e outros patógenos de origem alimentar.

Devido à variedade de métodos existentes, os trabalhos de FARBER (1996) e SWAMINATHAN, MATAR (1993) são de grande valor para uma melhor compreensão dos métodos genéticos utilizados na subtipagem de *L. monocytogenes*. Também THOMAS (1995) discute alguns destes métodos.

Dentre os métodos genéticos, os que utilizam a reação de polimerização em cadeia (PCR, "polymerase chain reaction") têm sido muito utilizados atualmente nas mais diversas áreas quando se tem como objetivo

avaliar as dissimilaridades do material genético celular. A técnica da PCR foi desenvolvida entre 1983 e 1985 pelo Dr. Kary Mullins e lhe rendeu um Prêmio Nobel de Química dez anos mais tarde. Pode ser explicada como um método *in vitro* para a síntese enzimática de seqüências específicas de DNA. Na PCR são usados dois pequenos fragmentos de DNA fita simples, usualmente com 20 nucleotídeos de comprimento, conhecidos como "primers" (PRESCOTT et al., 1996). Os "primers" têm orientação oposta e são complementares a sítios presentes em cada fita do DNA. A partir dos "primers" é iniciada a síntese de uma cópia da região delimitada por eles (FARBER, 1996; PRESCOTT et al., 1996).

Há três etapas principais na reação de polimerização em cadeia. A primeira, **desnaturação**, é feita a temperaturas elevadas e serve para desnaturar a fita dupla de DNA, separando-a em duas fitas simples. No segundo passo, **pareamento** ou **relaxamento** ("annealing"), os "primers" presentes na mistura de reação se ligam à sua região complementar no DNA alvo. A temperatura de pareamento usada é muito importante, pois determina a **especificidade** ("stringency") da reação. O terceiro passo, referido como **polimerização** ("polymerization"), envolve a extensão dos "primers" com a ajuda de uma DNA polimerase termoestável ("*Taq* DNA polymerase"), em presença de íons Mg^{+2} e dos quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTPs), e resulta na duplicação da região de interesse. Cada ciclo completo leva cerca de 5 min e duplica a quantidade de DNA produzida no ciclo prévio, sendo que para uma efetiva amplificação do DNA são requeridos 20 a 40 ciclos. Com isto consegue-se uma amplificação do DNA alvo de aproximadamente um bilhão de vezes. (FARBER, 1996)

Os métodos de subtipagem baseados em PCR podem ser classificados em dois grupos. O primeiro envolve a amplificação de uma seqüência gênica conhecida e inclui PCR-RFLP ("PCR-restriction-fragment length polymorphism"), PCR-ribotipagem e REP-PCR ("repetitive element sequence-based PCR"). O segundo grupo inclui o RAPD ("randomly

amplified polymorphic DNA") e envolve a amplificação aleatória de segmentos do DNA alvo usando um único "primer" cuja homologia com o DNA não é conhecida. Durante a PCR para o RAPD são gerados vários fragmentos de diversos tamanhos que são separados por eletroforese. A tipificação está baseada na comparação dos padrões de bandas gerados (FARBER, 1996; SWAMINATHAN, MATAR, 1993).

Na PCR-RFLP, também denominada PCR-REA ("PCR-restriction enzyme analysis"), após a amplificação da região alvo é feita clivagem com enzimas de restrição e os fragmentos gerados são então separados por eletroforese e comparados (FARBER, 1996; SWAMINATHAN, MATAR, 1993).

O alvo da amplificação da PCR-ribotipagem são as regiões espaçadoras ("spacer regions") entre os genes que codificam para o RNA ribossomal (rRNA) 16S e 23S. A maioria dos gêneros bacterianos contém múltiplas cópias do operon para o rRNA, então estas regiões espaçadoras podem diferir em tamanho e/ou seqüência. As múltiplas bandas obtidas a partir de uma cepa em particular representariam regiões espaçadoras de diferentes tamanhos em diferentes operons que codificam para o rRNA. Para este fim são utilizados "primers" complementares às regiões conservadas destes genes e, no caso de se desejar uma discriminação maior entre as cepas, ainda podem ser usados "primers" para amplificar a região espaçadora entre os genes do 23S e do 5S rRNA. (FARBER, 1996; SWAMINATHAN, MATAR, 1993)

Para o REP-PCR, utilizam-se "primers" baseados em seqüências curtas de elementos repetitivos, que estão dispersas no reino procarionte. Esses elementos parecem ser conservados entre diversos gêneros e espécies bacterianas. Conjuntos de "primers" baseados em seqüências de elementos repetitivos são usados para gerar os perfis moleculares e diferenças entre os tamanhos das bandas representam polimorfismos nas distâncias entre elementos repetitivos de diferentes genomas. Este método

tem sido aplicado para tipagem de vários gêneros bacterianos. (FARBER, 1996; JERŠEK et al., 1996; SWAMINATHAN, MATAR, 1993)

O RAPD é um dos mais novos métodos genotípicos baseados em PCR e tornou-se importante por sua excelente capacidade discriminatória, simplicidade e rapidez. Sua técnica foi primeiramente descrita por WELSH, MCCLELLAND (1990) e por WILLIAMS et al. (1990).

O uso da PCR para o RAPD difere da PCR tradicional principalmente quanto a dois aspectos. Primeiro, os "primers" usados são mais curtos (aproximadamente 10 nucleotídeos) e suas seqüências de bases são escolhidas ao acaso, não sendo necessário conhecimento prévio da seqüência alvo no DNA. A segunda diferença é que a temperatura de pareamento no RAPD é menor (baixa especificidade) que na PCR tradicional; isso permite que um único "primer", sem homologia conhecida com o genoma, possa se ligar a sítios com uma combinação imperfeita ("mismatching").

Quando dois sítios de pareamento ocorrem a distâncias tipicamente de 200pb até 2000pb um do outro e com orientação correta (5'→3') em fitas de DNA opostas, a seqüência entre os sítios pode ser amplificada. Todo sítio amplificado leva à formação de uma banda que pode ser visualizada em gel de agarose adicionado de brometo de etídio.

A origem dos diferentes padrões de bandas, ou polimorfismos, entre cepas diferentes pode ocorrer como resultado: (i) da perda de um sítio de "priming"; (ii) da inserção de porções de DNA que tornaria sítios de "priming" muito distantes; ou (iii) de inserções ou perdas de seqüências de bases entre os sítios, que mudam o tamanho de um segmento de DNA sem prevenir sua amplificação (FARBER, 1996).

Usualmente o DNA alvo da amplificação pelo RAPD deve ser previamente extraído (LIN, 1996; SILVA, 1998), porém há casos onde células íntegras do microrganismo podem ser empregadas (DESTRO et al.,

1996; FARBER, ADDISON, 1994; MAZURIER et al., 1992). Nestes casos, as células são lisadas durante o ciclo inicial ("hot start") que é empregado antes que os ciclos de amplificação sejam iniciados (FARBER, 1996).

O problema principal do RAPD está relacionado à sua pobre reprodutibilidade. Fatores como a temperatura de pareamento utilizada e a concentração de cloreto de magnésio na mistura de reação são causas possíveis (KIDD, RUANO, 1995). FARBER (1996) aponta ainda outros fatores que podem causar variações nos padrões de RAPD obtidos, tais como a pureza e composição do "primer" usado e a origem da *Taq* DNA polimerase. WAES (1998) cita como causas principais as diferenças entre aparelhos termocicladores e pequenas variações na concentração do tampão de PCR. Isso demonstra que o RAPD exige técnicos bem treinados, extrema atenção, equipamentos precisos, calibrados e reagentes de excelente qualidade.

Por outro lado, trabalhos como os de NIEDERHAUSER et al. (1994) e WERNARS et al. (1996) mostram que o método pode ser reprodutível sob condições cuidadosamente controladas.

O RAPD tem sido utilizado na tipagem de cepas de *L. monocytogenes* (GRAVESEN et al., 2000; KERR et al., 1995; LAWRENCE et al., 1993; MAZURIER, WERNARS, 1992; WAGNER et al., 1999) e outros microrganismos (HAYNES et al., 1995; LIN et al., 1996; MATTHEWS, OLIVER, 1994; WANG et al., 1993; YOUNG et al., 1994) de diversas origens, sendo sempre considerado rápido, reprodutível e relativamente barato e podendo ser implementado em laboratórios não muito equipados.

Quando avaliado para tipagem de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de humanos foi considerado de fácil execução, barato, apresentando capacidade de tipar todas as cepas com boa discriminação, especialmente se múltiplos "primers" forem usados (O'DONOGHUE et al., 1995).

Poucos pesquisadores têm utilizado o RAPD para traçar rotas de contaminação por *Listeria monocytogenes* ou outros microrganismos em plantas processadoras e de produção primária de alimentos (GIOVANNACCI et al., 1999; LAM, 1996; MORAIS, 1997; SILVA, 1998), porém ele é descrito como uma ferramenta eficaz na determinação de pontos potenciais de contaminação cruzada através da revelação de diferenças genéticas entre cepas estreitamente relacionadas.

LAWRENCE, GILMOUR (1995) empregaram RAPD e MEE para determinar as fontes de contaminação por *L. monocytogenes* das aves, e de seus derivados, em uma usina de processamento da Irlanda do Norte. Eles verificaram a existência de um genótipo endêmico àquela usina processadora, genótipo este presente desde o ambiente de recepção das aves vivas até o ambiente do produto já cozido, indicando que há uma contaminação contínua do ambiente e dos equipamentos. Da matéria-prima também se isolou cepas deste genótipo, mas não do produto logo após a cocção.

DESTRO et al. (1996) usaram o RAPD e a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para traçar a contaminação de *L. monocytogenes* em uma usina processadora de camarões do Brasil. Eles verificaram que os perfis genéticos obtidos para as cepas de origem ambiental eram exclusivos a elas, enquanto que cepas provenientes de amostras de água, de utensílios e equipamentos apresentavam perfis em comum. Um perfil genético comum às diferentes amostras camarão – da matéria prima ao produto final, mas diferente dos demais perfis – foi encontrado estando este mesmo perfil presente nas mãos dos manipuladores. Os autores concluíram que, face à variedade de fontes de *L. monocytogenes* na usina em questão, a eliminação deste microrganismo do produto final seria uma tarefa difícil, se não impossível.

WAGNER et al. (1996) usaram o RAPD como ferramenta para determinar rotas de contaminação por *Listeria* em um laticínio na Áustria. RAPD permitiu separar as cepas em dez grupos, mas apenas um deles foi

considerado pelos autores como real contaminante da planta. As cepas desse grupo RAPD pertenciam aos sorovares 1/2a, 1/2b e 3c. Os autores ressaltam a importância do uso de múltiplos "primers" para que se tenha suficiente discriminação entre as cepas isoladas de um pequeno habitat, como no caso de uma indústria.

Uma variação do RAPD tradicional foi estudada por ALLERBERGER et al. (1997). RAPD-Alfa ("automated laser fluorescence analysis") é um método rápido desenvolvido para a epidemiologia hospitalar e foi aplicado ao estudo epidemiológico da listeriose na Áustria ocidental. A metodologia para o RAPD é a mesma, variando o modo como são feitas a leitura e a interpretação dos diferentes padrões gerados. Os produtos de amplificação são separados em um seqüenciador automatizado e à ALFA cabe o papel de prover um melhor grau de resolução dos padrões. Os dados obtidos podem ser mostrados em tempo real como fluorogramas na tela do computador ou, após normalização, usados para comparação automatizada com outros perfis em uma análise de grupo realizada por computador. Os autores concluíram ser o RAPD-Alfa um método molecular adequado e eficiente para aplicação na tipagem de rotina de cepas de *Listeria monocytogenes*.

Além das dificuldades existentes para a execução dos métodos de tipagem, tem-se que considerar também as dificuldades de avaliação dos dados gerados. Não se encontra na literatura explicações claras e completas de como estes dados podem e devem ser agrupados. No entanto informações básicas sobre o assunto podem ser encontradas em SWAMINATHAN, MATAR (1993).

Também existe uma grande variedade de programas, pacotes e equipamentos disponíveis no mercado, e mesmo gratuitos na internet, que oferecem diferentes formas de avaliação dos dados o que dificulta ainda mais a escolha.

2. OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivos:

- Identificar subtipos de *L. monocytogenes* presentes na matéria-prima (carne de frango) e avaliar seu comportamento durante o processamento do produto.

- Identificar rotas de contaminação do produto em processamento por cepas de *L. monocytogenes*, avaliando a importância de equipamentos, ambiente de produção e manipuladores na transmissão de subtipos específicos deste microrganismo ao produto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ORIGEM DAS CEPAS

As cepas de *L. monocytogenes* usadas neste trabalho foram isoladas a partir de amostras de carne de frango e "nuggets" colhidas nas diferentes etapas do processamento, amostras ambientais e de manipuladores, coletadas em usina de processamento industrial (RODRIGUES, 1999).

Segue uma breve descrição do processamento dos "nuggets". Da matéria-prima recebida (coxa+sobrecoxa e peito de frango desossados) na indústria, são separados aproximadamente 300kg para inspeção de qualidade e o restante é armazenado em câmaras refrigeradas (2 a 4°C) até o momento do uso. O processamento se inicia com a matéria-prima sendo marinada em um "tumbler" e a seguir sendo transferida para um cominutador onde a carne de frango é picada em pedaços regulares. A carne é transformada em massa quando levada ao misturador e resfriada a aproximadamente 0°C através da injeção de gás carbônico. Na próxima etapa a massa recebe o formato de "nuggets" ao passar pelos moldes da formatadora. Os "nuggets" são transportados por esteiras rolantes e passam pelos diversos equipamentos de empanagem, sendo então submetidos a pré-fritura e congelamento em túnel de nitrogênio. Depois de congelados os "nuggets" passam por um detector de metal e por um aspersor de água, indo para a balança dosadora onde são acondicionados em embalagem de polietileno e selados. Procede-se então a embalagem secundária em caixas de papelão e estocagem em câmara fria (-18 a -24°C) onde permanecem por 24h antes de serem distribuídos.

Nas figuras 1 a 3 tem-se a representação esquemática das etapas de produção dos "nuggets" com os respectivos pontos de coleta das amostras de onde foram isoladas as cepas de *L. monocytogenes*. Estas cepas foram testadas quanto à sua pureza e mantidas em ágar conservação sob refrigeração comercial. Dentre as cepas de *L. monocytogenes* isoladas

foram escolhidas aleatoriamente três a doze de cada ponto de coleta, representativas de diferentes processamentos, com exceção do ponto de coleta S23 do qual foi obtido somente um isolado. Desta forma foi selecionado um total de 272 cepas de *Listeria monocytogenes* a serem utilizadas.

Também foram utilizadas cepas de *Listeria innocua* e *Listeria seeligeri* provenientes do mesmo ambiente industrial e cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A e *Escherichia coli* da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estas cepas serviram como "outgroups" na etapa de tipagem por RAPD.

3.2. TIPAGEM POR RAPD

3.2.1. Preparo das células de *Listeria* sp.

Na figura 4 tem-se a representação esquemática das etapas de preparo das células de *Listeria* sp. para serem utilizadas no RAPD.

As culturas provenientes do ágar conservação foram semeadas em ágar soja tripticase (Oxoid, England) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco, USA) (TSA-YE) e incubadas a 37°C por 24h. Uma colônia foi transferida para caldo soja tripticase (Difco) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e incubada a 37°C por 24h. Foram transferidos 3ml desta cultura para tubos Eppendorf que foram centrifugados a 15000×g por 3min. As células foram suspensas com 1ml de solução salina (NaCl 0,85%, p/v [Nuclear, Brasil]), novamente centrifugadas a 15000×g por 3min e suspensas com 30µl de solução salina. A suspensão de células obtida foi denominada "E" (estoque).

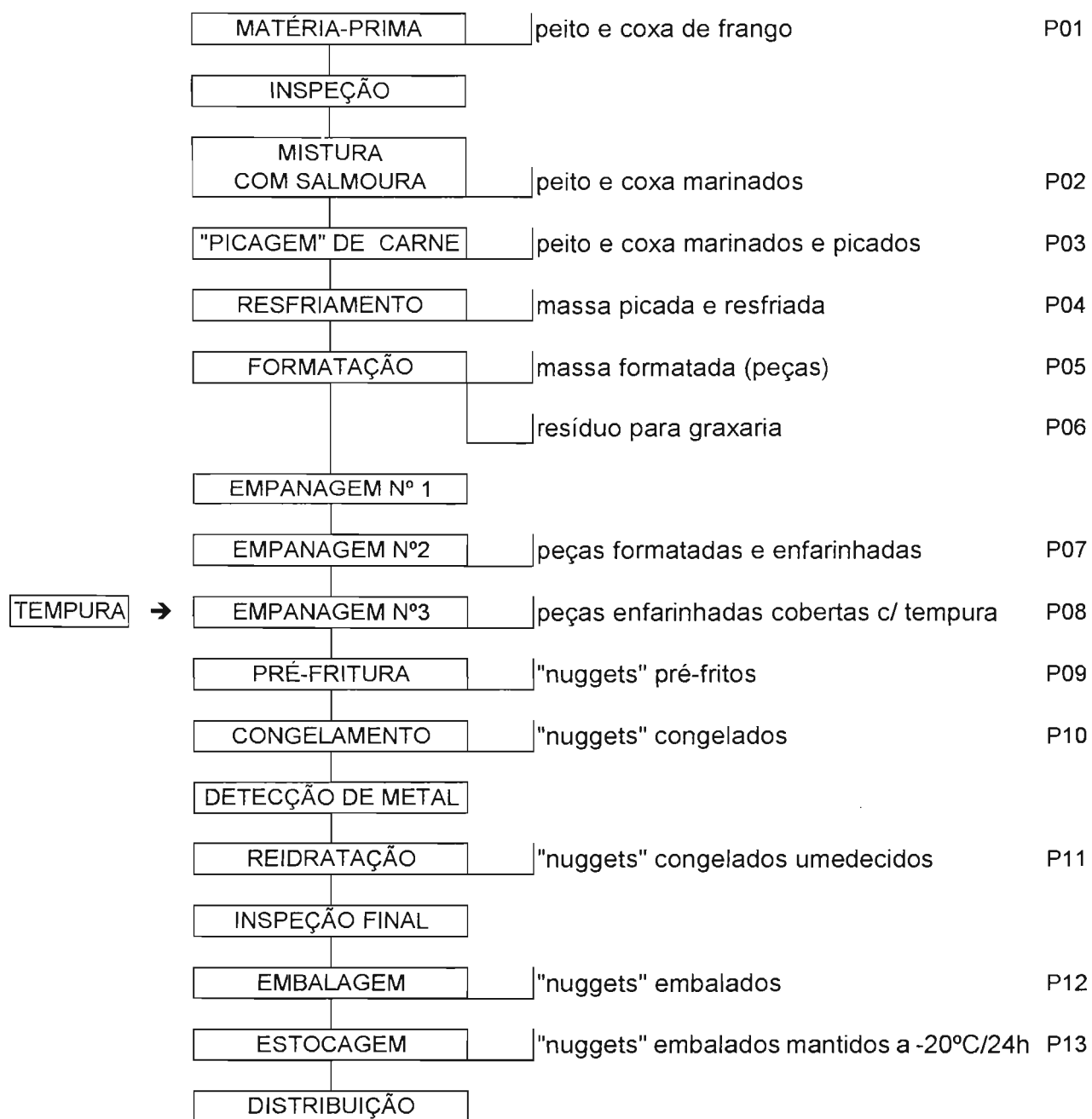


Figura 1. Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de produto (P). Adaptado de RODRIGUES (1999).

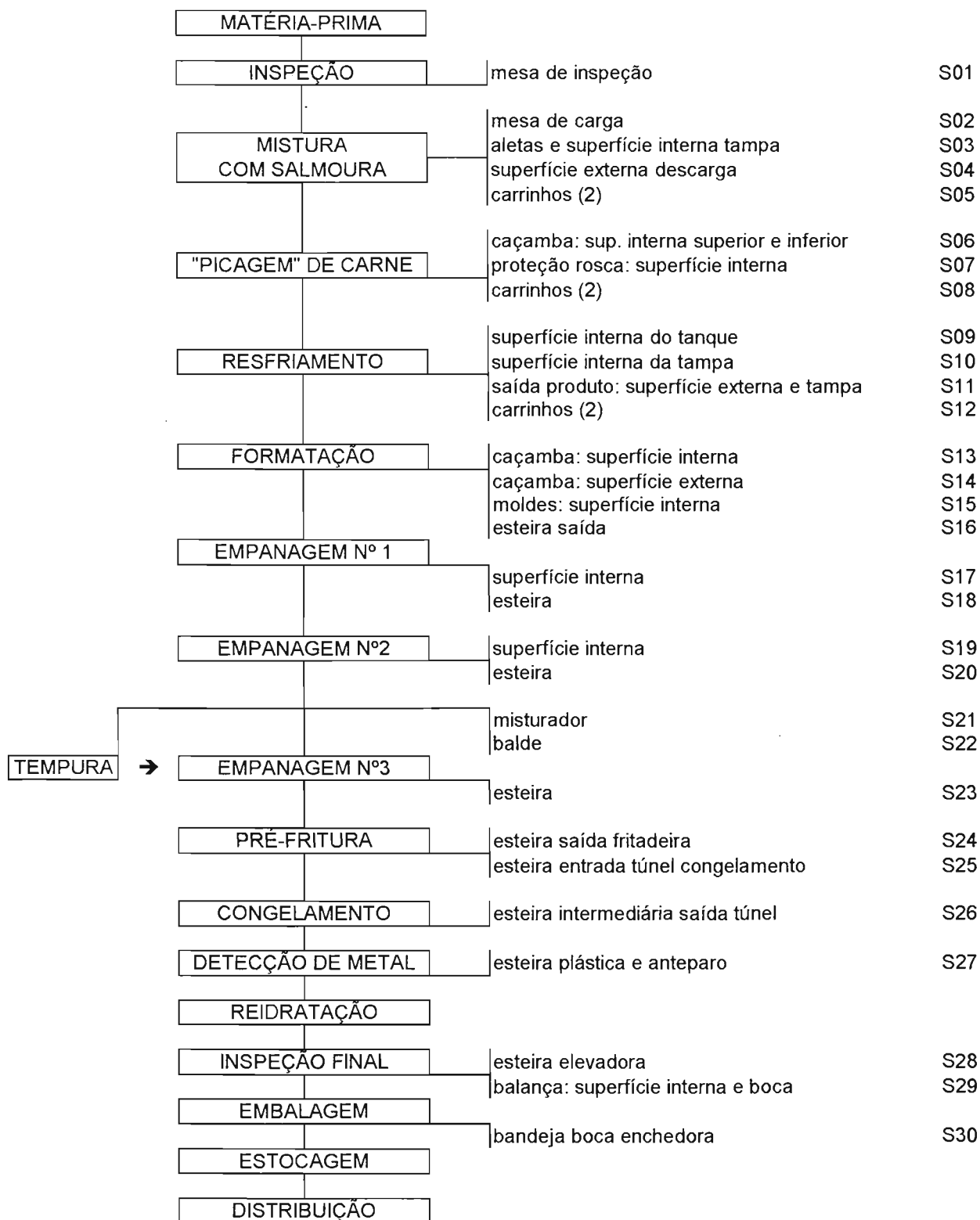


Figura 2. Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de superfícies de equipamentos (S). Adaptado de RODRIGUES (1999).

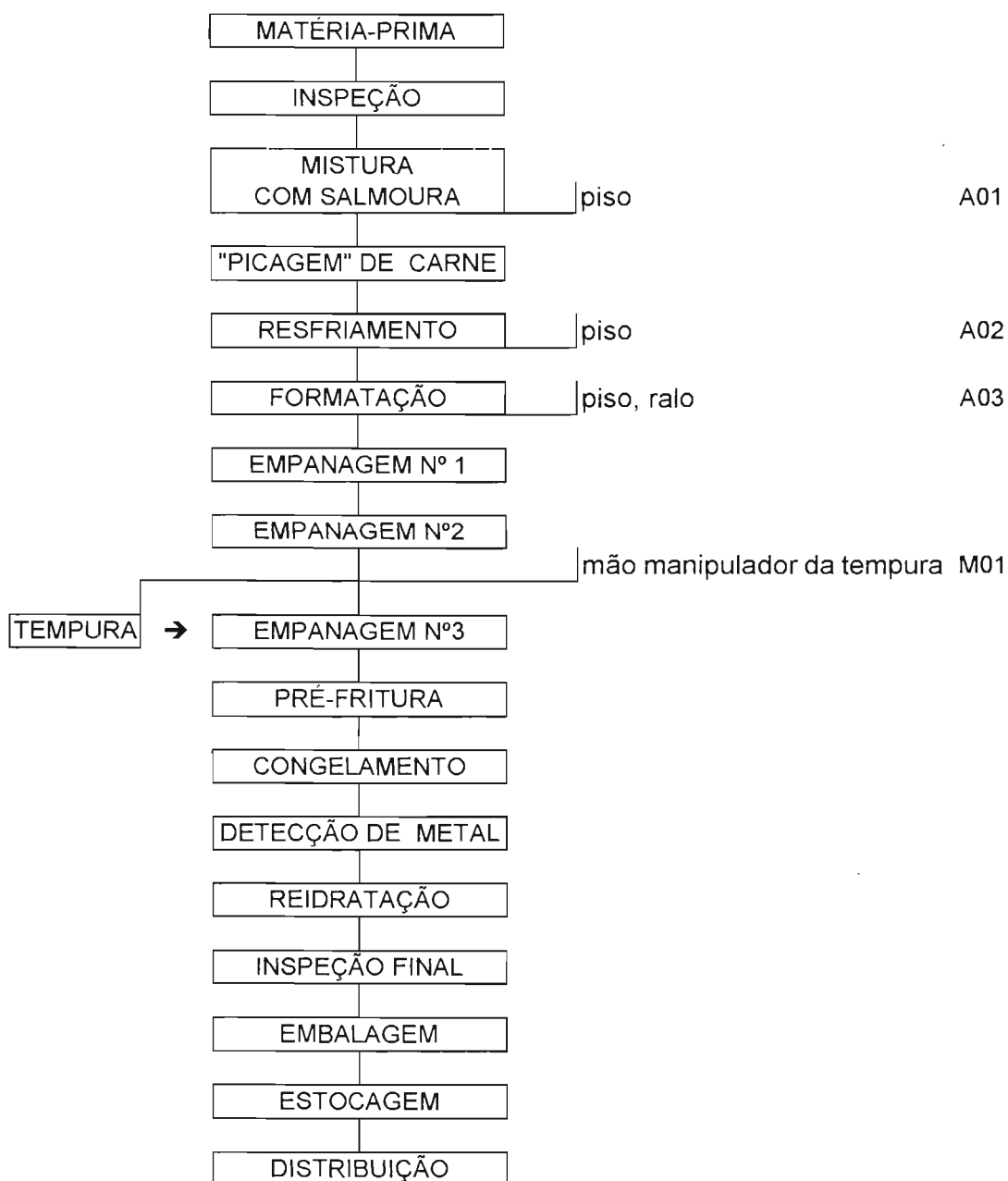


Figura 3. Representação esquemática do processamento industrial dos "nuggets" congelados de frango, indicando os pontos de coleta das amostras de ambiente (A) e de manipulador (M). Adaptado de RODRIGUES (1999).

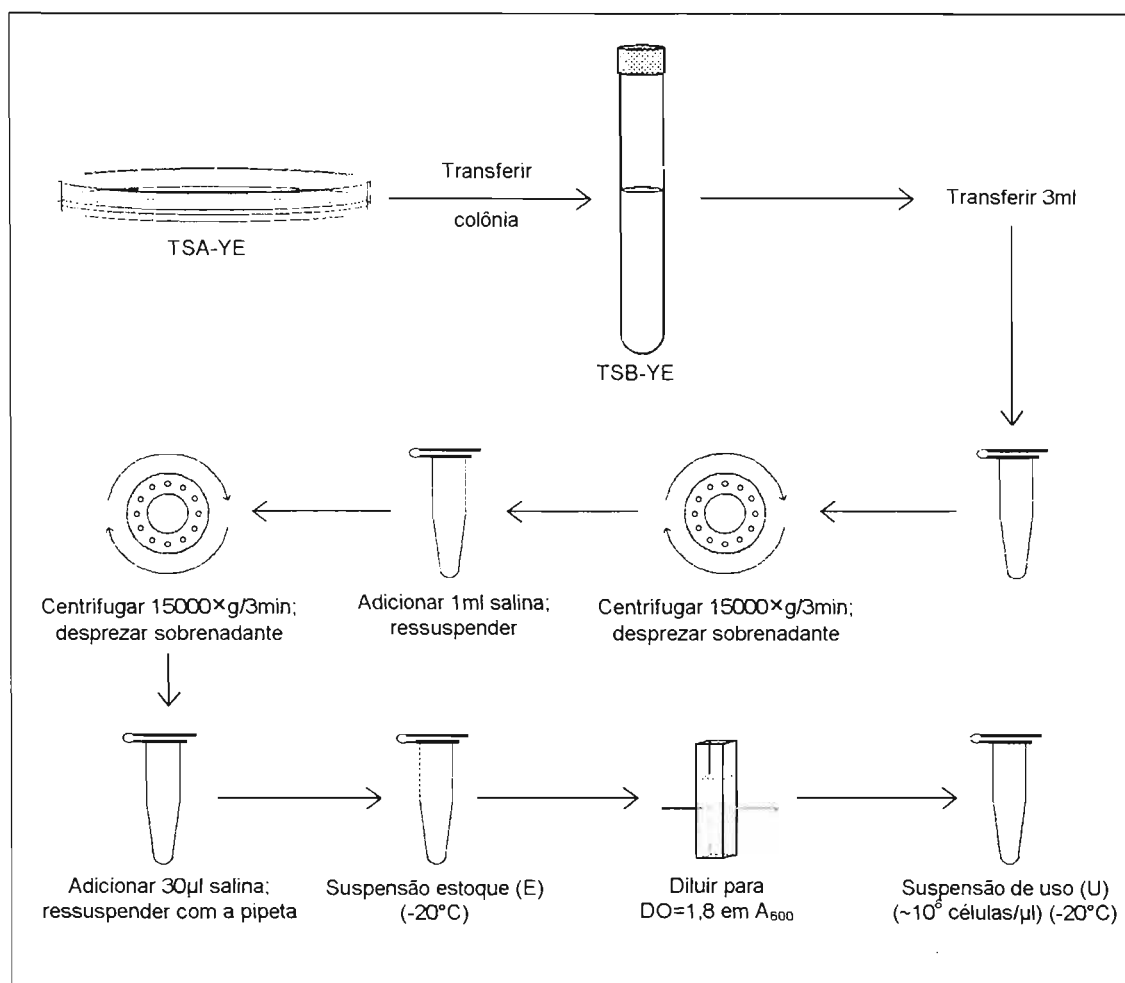


Figura 4. Representação esquemática do preparo das suspensões de células de *Listeria* para serem usadas na tipagem por RAPD.

Foi determinada então a absorvância a 600nm (A_{600}) desta suspensão. O valor obtido deve estar entre 0,2 e 0,8 e corrige-se a concentração de células de modo a obter uma suspensão com densidade ótica de 1,8 a 600nm. Para esta correção deve-se multiplicar o valor A_{600} obtido pelo fator de diluição utilizado no preparo da suspensão submetida à determinação de A_{600} , dividindo-se então por 1,8. O valor obtido é o número de vezes que a suspensão "E" deve ser diluída para que se obtenha uma suspensão de uso "U" com a concentração adequada. Por exemplo: se o valor for igual a 11, deve ser adicionada uma parte de suspensão "E" a cada 10 partes de água destilada deionizada, estéril (ADD). A suspensão "U" tem

uma concentração de células de *Listeria monocytogenes* de aproximadamente 10^6 células/ μl (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997).

Um volume adequado da suspensão "U" foi preparado e congelado a -20°C até o momento do uso. O restante da suspensão estoque foi conservado da mesma forma.

Para cada isolado estudado foram preparadas suspensões de células em dois dias diferentes.

3.2.2. Preparo do DNA de *E. coli*

O DNA de *Escherichia coli* – usado como controle positivo da PCR – foi extraído usando-se o kit InstaGene Matrix (Bio-Rad, USA), conforme instruções do fabricante. Foram preparadas soluções de uso com $5\text{ng}/\mu\text{l}$, sendo a concentração de DNA no extrato determinada conforme descrito a seguir.

Uma alíquota de $5\mu\text{l}$ de extrato foi adicionada, em cubeta de quartzo, a 1ml de ADD. As absorbâncias a 260nm (A_{260}) e 280nm (A_{280}) foram determinadas para esta solução. Quando os valores obtidos foram menores que $0,01$, concentrou-se mais a amostra e as absorbâncias foram novamente determinadas. A pureza da amostra foi avaliada dividindo-se o valor obtido para A_{260} pelo obtido para A_{280} . Quando o resultado situou-se entre $1,8$ e $2,0$ a concentração de DNA no extrato foi determinada, considerando-se que $\text{DO}_{260}=1,0$ corresponde a $50\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA fita dupla (SAMBROOK et al., 1989).

3.2.3. PCR

Para a PCR empregou-se o protocolo recomendado pelo grupo de subtipagem de *L. monocytogenes* da WORLD HEALTH ORGANIZATION (1997) com ligeiras modificações, a saber: concentração de MgCl_2 aumentada de $1,5$ para 3mM ; e conjunto de "primers". Foi preparada uma mistura de reação para PCR ("master mix") contendo: 10mM Tris, 50mM

KCl, 3mM MgCl₂ (Pharmacia, Sweden); 50μM de cada dNTP (Pharmacia); 1μM de "primer" (UBC155 [5' CTG GCG GCT G 3'] [FARBER, ADDISON, 1994; DESTRO et al., 1996] ou M13 [5' GAG GGT GGC GGT TCT 3'] [WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1997] [Bio-Synthesis, USA]); e 1U de *Taq* DNA polimerase (Pharmacia). Alíquotas de 23μl da "master mix" foram distribuídas em tubos de Eppendorf e adicionadas de 2μl de suspensão de células de *Listeria* preparada conforme descrito em 3.2.1.

Os tubos foram termociclados (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) seguindo o programa: um ciclo de 94°C por 8 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto → 35°C por 2 minutos → 72°C por 2 minutos; e um ciclo de 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação foram mantidos a 4°C até o momento do uso. Um controle positivo (10ng DNA de *E. coli*) e um controle negativo (2μl de ADD) foram adicionados para cada "primer".

As duas suspensões de trabalho de cada cepa foram submetidas a PCR em dias diferentes de forma a evitar a interferência das condições de amplificação. Cada suspensão foi submetida a pelo menos duas amplificações.

3.2.4. Eletroforese

Os produtos amplificados foram adicionados de 3μl de tampão para eletroforese ("loading buffer") (SAMBROOK, 1989) e separados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Agarose NA, Pharmacia) em TBE (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Pharmacia]; pH 8,0) (SAMBROOK, 1989) contendo 0,3μg/ml de brometo de etídio (Pharmacia) (DILLON et al., 1985). Um marcador de peso molecular de 250pb (Life Technologies, USA) foi usado como padrão.

A seguir o gel foi examinado sob transiluminação UV 302nm (MacroVue transilluminator, Pharmacia) e os padrões de bandas registrados com o sistema MP4+ (Polaroid, USA).

3.3. TIPAGEM SOROLÓGICA

As cepas de *L. monocytogenes* foram sorotipadas com os antissoros O tipo 1 e tipo 4 para *Listeria* (Difco, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os padrões gerados com cada "primer" pelo RAPD foram comparados visualmente e as cepas agrupadas conforme seus perfis. Os pesos moleculares das bandas foram calculados com o sistema EDAS120 (Eastman Kodak, USA).

Os resultados obtidos com cada "primer" foram combinados entre si e a correlação entre os perfis foi verificada com auxílio do programa NTSYSpc 2.0 (Exeter Software, USA), usando-se o coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945). O mesmo programa foi usado para construir um dendograma baseado na análise de "clusters" UPGMA ("Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average") (SNEATH, SOKAL, 1973).

Os "clusters" formados pelos perfis RAPD combinados foram relacionados aos resultados da tipagem sorológica para a determinação dos subtipos. O índice de discriminação D (HUNTER, GASTON, 1988) foi determinado para avaliar o poder discriminatório da tipagem. A diversidade genética das cepas foi então correlacionada com a distribuição de *L. monocytogenes* na linha de processamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 272 cepas de *L. monocytogenes* inicialmente selecionadas, 20 (7,4%) apresentaram perfis RAPD irregulares e/ou não-reprodutíveis após diversas repetições. Não podendo ser tipadas, foram excluídas do estudo. O ponto de coleta S30 passou a ser representado por apenas duas cepas, constituindo exceção ao plano de amostragem, juntamente com o ponto S23 (vide 3.1). Desta forma, o total de cepas de *L. monocytogenes* efetivamente estudado foi de 252, sendo 128 cepas provenientes de produto, 101 de superfícies de equipamentos, 17 de ambiente e seis de manipulador (tabelas 1 e 2).

Com os "primers" M13 e UBC155 foram obtidos respectivamente 17 e 23 perfis RAPD diferentes para as cepas de *L. monocytogenes*. Estes perfis são apresentados nas figuras 5 e 6 e seus padrões de bandas estão representados nas figuras 7 e 8.

Os 17 perfis RAPD gerados com o "primer" M13 para as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram de nove a 16 bandas, com pesos moleculares variando de 237 a 3657 pares de bases (pb) (figuras 5 e 7). As bandas de 788, 1065, 1560 e 1771pb estiveram presentes em 100,0% (17/17) dos perfis gerados para as cepas de *L. monocytogenes*. As bandas de 788 e 1560pb também estavam no perfil gerado para a cepa de *L. innocua* e a banda de 1065pb estava no perfil gerado para *L. seeligeri*. A cada perfil de DNA pertenceram de uma a 58 cepas (tabela 3) e os perfis com maior número de cepas foram m11, m05 e m01, com 58 (23,0%), 45 (17,9%) e 34 (13,5%) cepas, respectivamente. Estes três perfis juntos reuniram 137 (54,4%) cepas.

Tabela 1. Origem das 128 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas das amostras de produto (P) coletadas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango.

Ponto de coleta ^a	Total de cepas	Etapa do processamento	Tipo de amostra	Cepas
P01	10	Matéria-prima	Peito e coxa de frango	1 a 10
P02	11	Mistura com salmoura	Peito e coxa marinados	11 a 21
P03	11	"Picagem" de carne	Peito e coxa marinados e picados	22 a 32
P04	12	Resfriamento	Massa picada e resfriada	33 a 44
P05	11	Formatação	Massa formatada (peças)	45 a 55
P06	12	Formatação	Resíduo para graxaria	56 a 67
P07	8	Empanagem n° 2	Peças formatadas e enfarinhadas	68 a 75
P08	10	Empanagem n° 3	Peças enfarinhadas cobertas com tempura	76 a 85
P09	8	Pré-fritura	"Nuggets" pré-fritos	86 a 93
P10	8	Congelamento	"Nuggets" congelados	94 a 101
P11	7	Reidratação	"Nuggets" congelados umedecidos	102 a 108
P12	9	Embalagem	"Nuggets" embalados	109 a 117
P13	11	Estocagem	"Nuggets" embalados mantidos a -20°C por 24h	118 a 128

^a Consultar figura 1 para localização dos pontos de coleta.

Tabela 2. Origem das 124 cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas das amostras de ambiente (A), manipulador (M) e superfícies de equipamentos (S) coletadas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango.

Ponto de coleta ^a	Total de cepas	Etapa do processamento	Local / Mão / Superfície	Cepas
S01	4	Inspeção	Mesa de inspeção	129 a 132
S02	3	Mistura com salmoura	Mesa de carga	133 a 135
S03	4	Mistura com salmoura	Aletas e superfície interna da tampa	136 a 139
S04	5	Mistura com salmoura	Superfície externa de descarga	140 a 144
S05	5	Mistura com salmoura	Carrinhos	145 a 149
A01	5	Mistura com salmoura	Piso	150 a 154
S06	3	"Picagem" de carne	Caçamba: superfície interna superior e inferior	155 a 157
S07	5	"Picagem" de carne	Proteção da rosca: superfície interna	158 a 162
S08	5	"Picagem" de carne	Carrinhos	163 a 167
S09	3	Resfriamento	Superfície interna do tanque	168 a 170
S10	4	Resfriamento	Superfície interna da tampa	171 a 174
S11	5	Resfriamento	Saída de produto: superfície externa e tampa	175 a 179
S12	4	Resfriamento	Carrinhos	180 a 183
A02	6	Resfriamento	Piso	184 a 189
S13	3	Formatação	Caçamba: superfície interna	190 a 192
S14	3	Formatação	Caçamba: superfície externa	193 a 195

continua

continuação

Ponto de coleta ^a	Total de cepas	Etapa do processamento	Local / Mão / Superfície	Cepas
S15	3	Formatação	Moldes: superfície interna	196 a 198
S16	3	Formatação	Esteira de saída	199 a 201
A03	6	Formatação	Piso, ralo	202 a 207
S17	3	Empanagem n° 1	Superfície interna	208 a 210
S18	3	Empanagem n° 1	Esteira	211 a 213
S19	3	Empanagem n° 2	Superfície interna	214 a 216
S20	3	Empanagem n° 2	Esteira	217 a 219
M01	6	Tempura	Mão manipulador da tempura	220 a 225
S21	3	Tempura	Misturador	226 a 228
S22	3	Tempura	Balde	229 a 231
S23	1	Empanagem n° 3	Esteira	232
S24	3	Pré-fritura	Esteira de saída da fritadeira	233 a 235
S25	3	Pré-fritura	Esteira de entrada do túnel de congelamento	236 a 238
S26	3	Congelamento	Esteira intermediária de saída do túnel	239 a 241
S27	3	Detecção de metal	Esteira plástica e anteparo	242 a 244
S28	3	Inspeção final	Esteira elevadora	245 a 247
S29	3	Inspeção final	Balança: superfície interna e boca	248 a 250
S30	2	Embalagem	Bandeja da boca enchedora	251 e 252

^a Consultar figuras 2 e 3 para localização dos pontos de coleta.

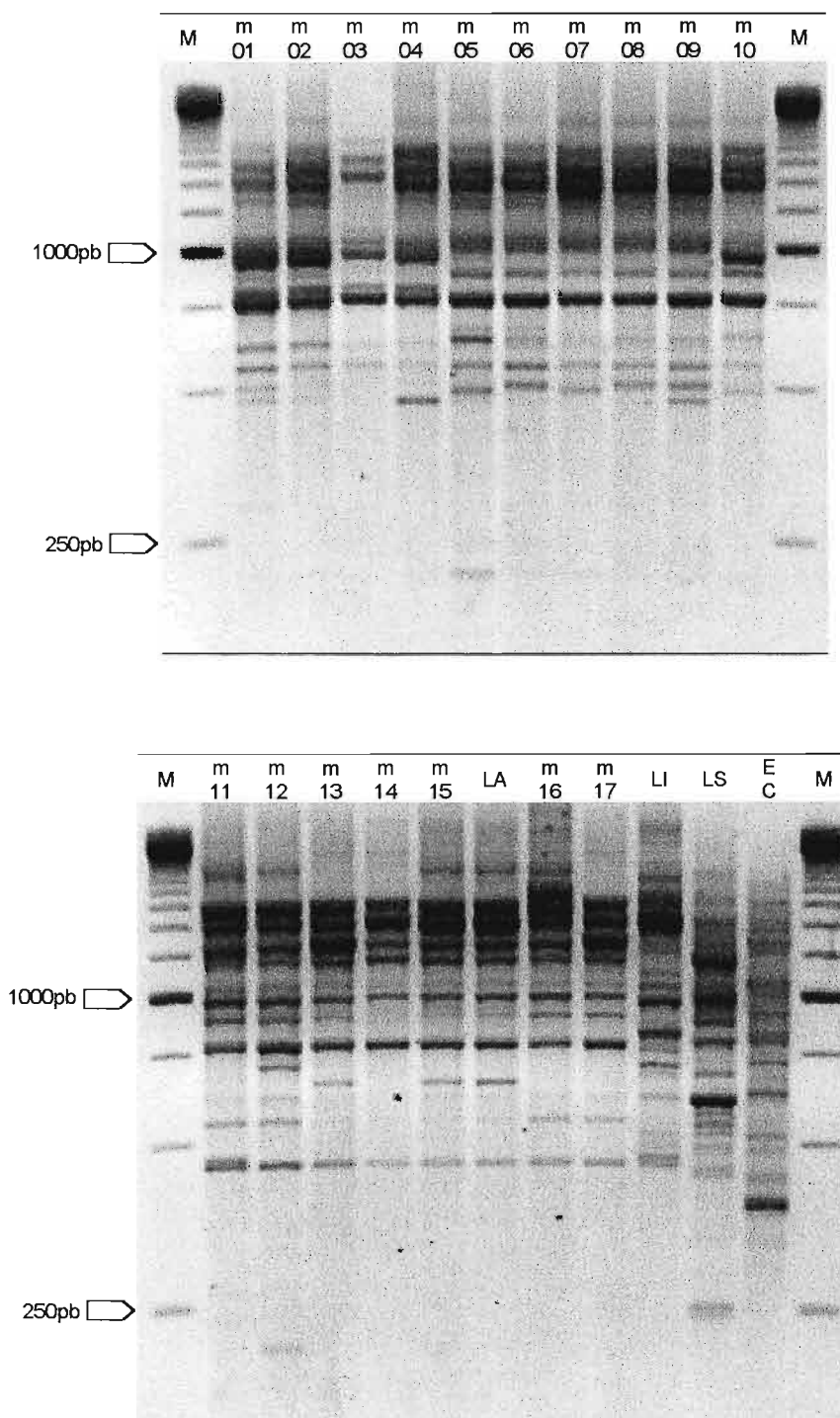


Figura 5. Perfis RAPD obtidos com o "primer" M13 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* (m01 a m17) isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A (LA), *L. innocua* (LI), *L. seeligeri* (LS) e *E. coli* (EC); M = marcador de peso molecular 250pb. Fotografia: sistema EDAS120.

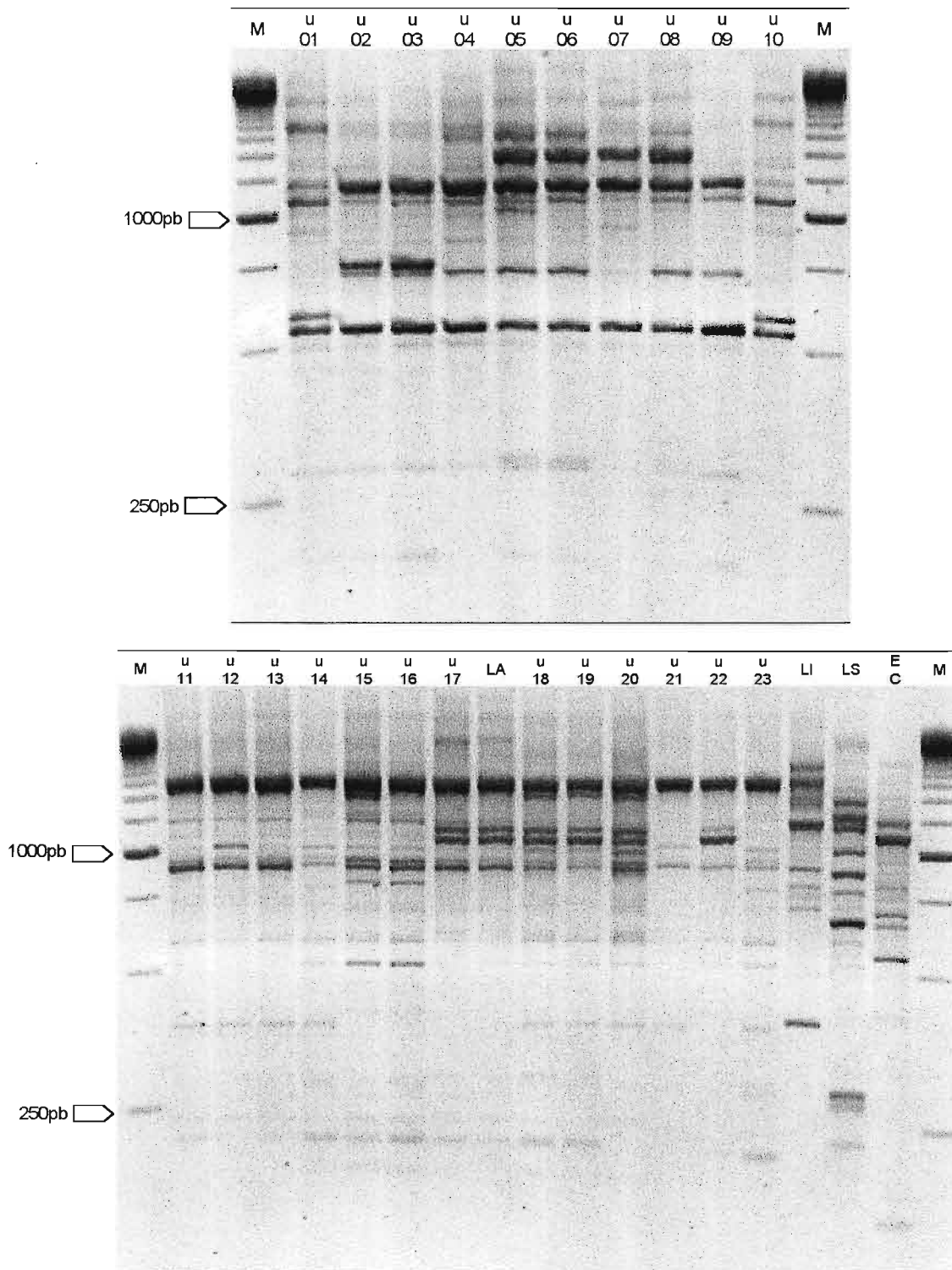


Figura 6. Perfis RAPD obtidos com o "primer" UBC155 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* (u01 a u23) isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A (LA), *L. innocua* (LI), *L. seeligeri* (LS) e *E. coli* (EC); M = marcador de peso molecular 250pb. Fotografia: sistema EDAS120.

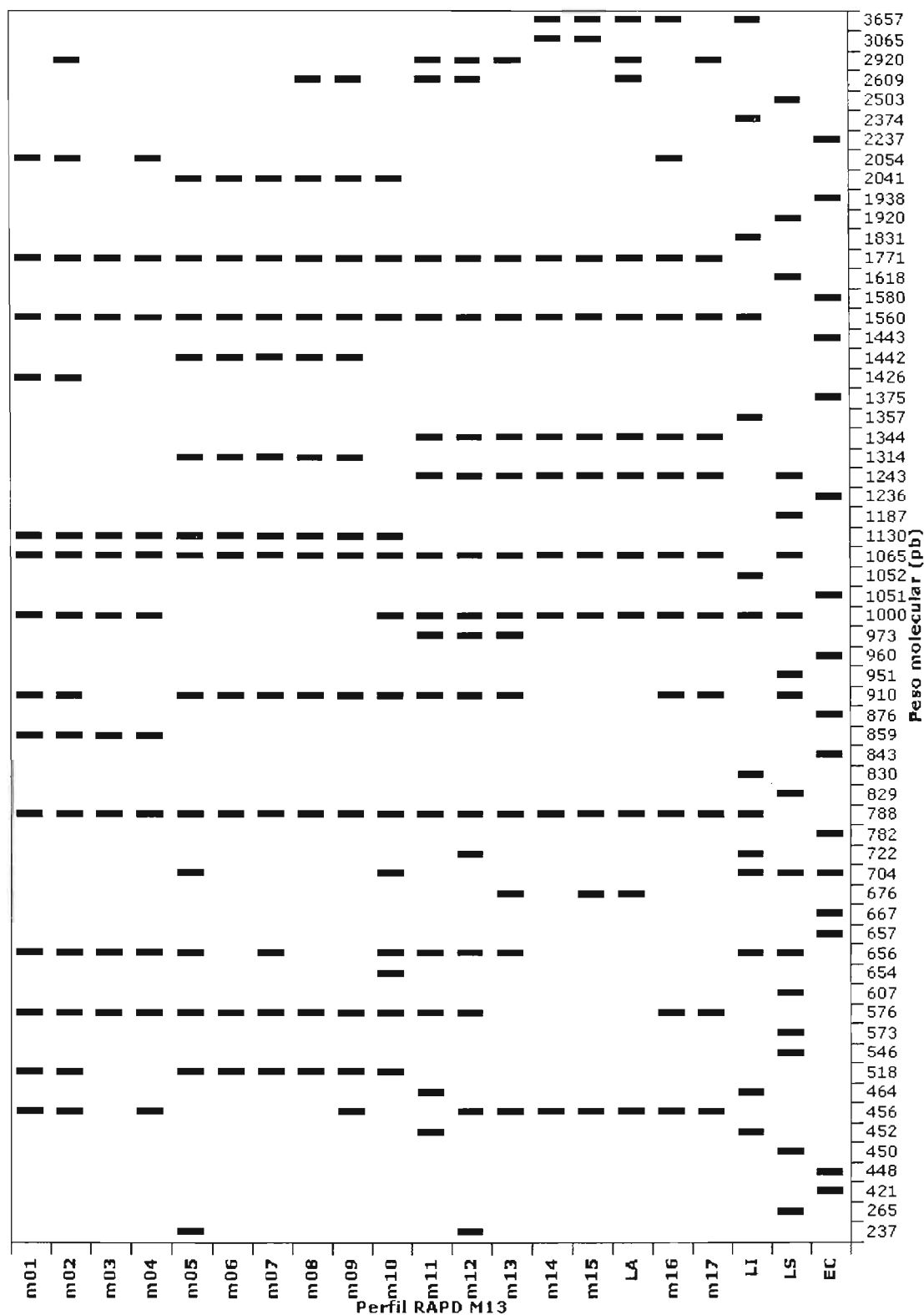


Figura 7. Representação dos padrões de bandas dos perfis RAPD obtidos com o "primer" M13 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* (m01 a m17) isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A (LA), *L. innocua* (LI), *L. seeligeri* (LS) e *E. coli* (EC).

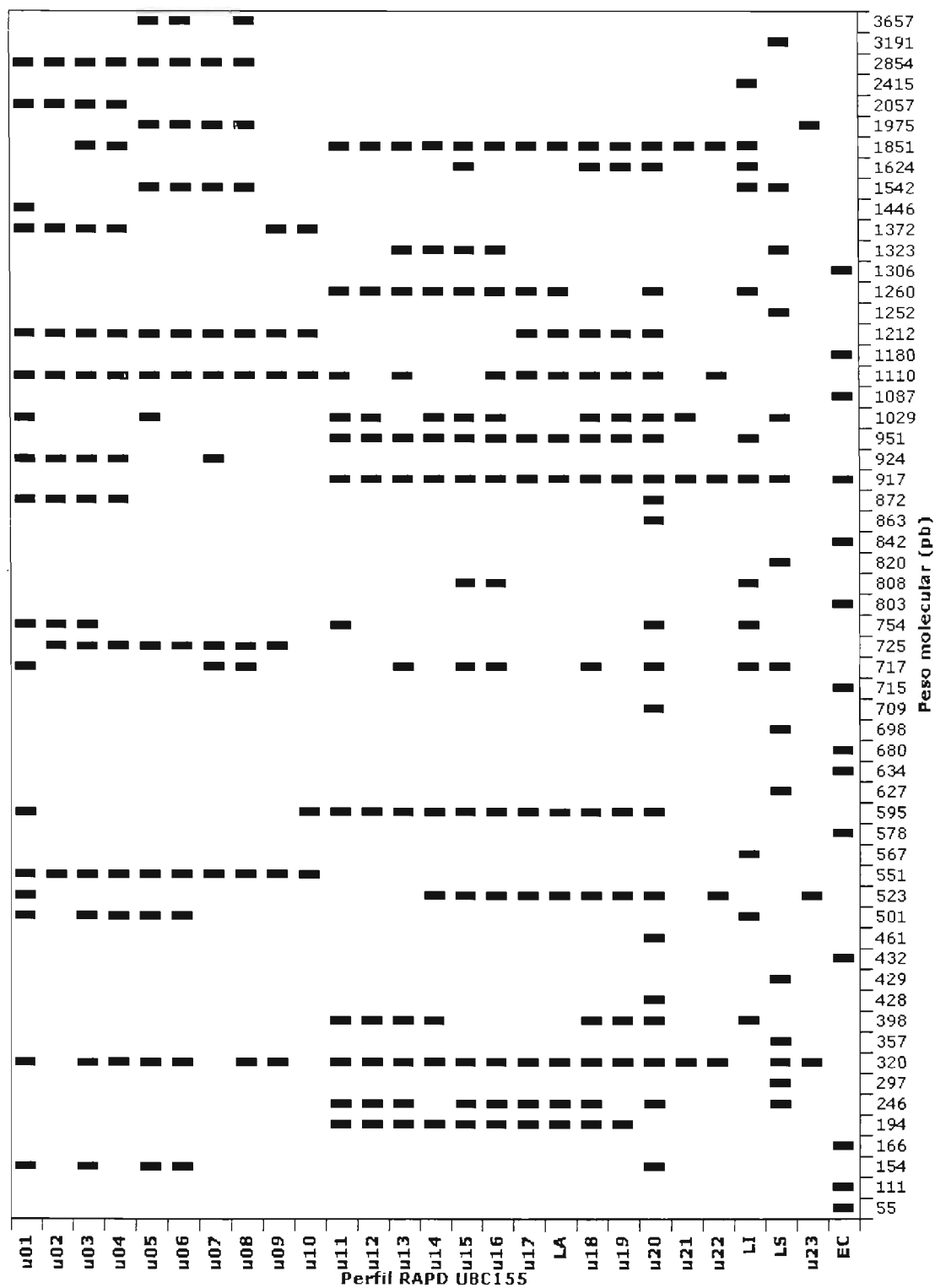


Figura 8. Representação dos padrões de bandas dos perfis RAPD obtidos com o "primer" UBC155 para as 252 cepas de *L. monocytogenes* (u01 a u23) isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, *L. monocytogenes* Scott A (LA), *L. innocua* (LI), *L. seeligeri* (LS) e *E. coli* (EC).

Conforme pode ser verificado nas figuras 6 e 8, os 23 perfis RAPD gerados com o "primer" UBC155 apresentaram de três a 21 bandas, com pesos moleculares variando de 154 a 3657pb. As bandas de 320, 1110, 1212 e 1851pb estiveram presentes em 87,0% (20/23), 78,3% (18/23), 60,9% (14/23) e 60,9% (14/23) dos perfis gerados para as cepas de *L. monocytogenes*, respectivamente. A banda de 320pb estava presente também no perfil gerado para *L. seeligeri*. A cada perfil de DNA pertenceram de uma a 30 cepas (tabela 4) e os perfis com maior número de cepas foram u10 (30 cepas, 11,9%), u02 (27 cepas, 10,7%), u06 (24 cepas, 9,5%) e u01 (20 cepas, 7,9%). Estes quatro perfis juntos reuniram 101 (40,1%) cepas. O perfil obtido para a cepa de *L. monocytogenes* Scott A foi idêntico ao perfil u17.

Convencionou-se chamar de "perfis RAPD combinados" das cepas (tabela 5) àqueles padrões obtidos pela combinação dos perfis RAPD gerados individualmente com os "primers" M13 e UBC155. Desta forma, as 252 cepas de *L. monocytogenes* foram distribuídas entre 50 perfis RAPD combinados e as cepas de *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. monocytogenes* Scott A e *E. coli* em outros quatro perfis. Em cada perfil RAPD foram alocadas de uma a 22 cepas de *L. monocytogenes*. Os perfis com maior número de cepas foram R10, R01 e R09 com 22 (8,7%), 21 (8,2%) e 20 (7,9%) cepas, respectivamente. Estes três perfis RAPD reuniram 63 (25,0%) cepas. O dendograma apresentado na figura 9 permite a visualização da relação genética entre os perfis RAPD combinados.

A fim de verificar o poder discriminatório do método de tipagem empregado calculou-se o índice de discriminação *D* (HUNTER, GASTON, 1988). O poder discriminatório de um método de tipagem está relacionado à sua habilidade para distinguir cepas não relacionadas e é determinado pelo número de tipos definidos pelo método e pela frequência relativa destes tipos. Os autores citados propõem o cálculo do índice numérico de discriminação *D* para facilitar a comparação entre diferentes métodos de tipagem.

Neste estudo, o valor do índice de discriminação D calculado para a tipagem por RAPD considerando os 50 grupos RAPD encontrados foi igual a 0,990. O índice de discriminação D calculado para os 17 perfis obtidos com o "primer" M13 foi igual a 0,872 e para os 23 perfis obtidos com o "primer" UBC155 foi igual a 0,935, revelando uma melhor capacidade de subtipagem deste último "primer" em relação ao "primer" M13.

O bom desempenho do UBC155 para a tipagem de *L. monocytogenes* por RAPD também foi verificado por FARBER, ADDISON (1994) e por DESTRO et al. (1996). Os primeiros selecionaram os "primers" UBC155, UBC 156 e UBC127 para subtipar 25 cepas de *L. monocytogenes* e observaram que o "primer" UBC155 foi particularmente útil na diferenciação dos isolados de *L. monocytogenes*. DESTRO et al. (1996) usaram os "primers" UBC155 e UBC127 e, apesar de terem obtido maior número de perfis com o segundo, ressaltaram a boa capacidade do primeiro em diferenciar os isolados de *L. monocytogenes*.

HUNTER, GASTON (1988) afirmam que um índice de discriminação maior que 0,90 é necessário para que haja uma boa diferenciação entre as cepas e os resultados obtidos neste trabalho são equivalentes ou mesmo superiores àqueles obtidos por outros pesquisadores também utilizando o RAPD. O'DONOGHUE et al. (1995) apresentam uma forma alternativa de analisar os padrões de bandas gerados pelo RAPD, baseando-se na intensidade e reprodutibilidade destes. Estes autores usaram seis "primers" para subtipar 95 cepas de *L. monocytogenes* de origem humana, obtendo índices de discriminação da ordem de 0,452 e 0,974, considerando, respectivamente, apenas as bandas fortes e reprodutíveis ou também bandas mais fracas e menos fáceis de distinguir.

KEROUANTON et al. (1998) usaram RAPD com apenas um "primer" e obtiveram um índice de discriminação D igual a 0,857 ao subtipar cepas de *L. monocytogenes* de diversas origens. GRAVENSEN et al. (2000) usaram RAPD com dois "primers" para subtipar 48 cepas de *L. monocytogenes*

originárias de suínos, seus produtos e ambientes de processamento, obtendo índice de discriminação D igual a 0,793.

WERNARS et al. (1996) em um estudo multi-laboratorial visando a padronização da técnica do RAPD para *L. monocytogenes* obtiveram índices de discriminação médios variando entre 0,75 e 0,90 para cada um de quatro "primers" ao subtipar 34 cepas não relacionadas epidemiologicamente. Pela combinação de três dos "primers" o índice de discriminação médio foi de 0,95. Estes autores destacam ainda a importância do uso de "primers" adicionais quando o valor do índice de discriminação for muito baixo.

Os altos índices de discriminação obtidos no presente trabalho ajudam a demonstrar que os resultados obtidos com a técnica empregada são válidos e significativos. Porém, um fator que pode ter contribuído para a obtenção destes valores elevados pode ter sido a grande quantidade de cepas estudadas, supondo-se que quanto maior o número de organismos estudados maior a possibilidade de se detectar pequenas variações genéticas entre eles.

Analisando-se a figura 9 observa-se que as cepas podem ser divididas em dois grandes "clusters": I e II. O primeiro "cluster" é formado pelos perfis RAPD R01 a R22 e o segundo pelos perfis R23 a R50. Esta é uma forte indicação de que as cepas de *L. monocytogenes* utilizadas neste estudo teriam duas origens genéticas distintas. Isto também pôde ser verificado pelos resultados obtidos com cada "primer" individualmente (dados não apresentados).

Os "clusters" I e II dividem-se em dois outros "clusters" cada: Ia, Ib; e IIa, IIb, respectivamente. Estas divisões podem ser decorrentes de mudanças genéticas recentes, tais como deleção ou inserção de bases, decorrentes, por exemplo, de pressões ambientais (LEWIN, 1998). As cepas de *L. innocua*, *L. seeligeri* e *E. coli* apresentaram perfis completamente distintos das demais cepas avaliadas. A cepa de *L. monocytogenes* Scott A apresentou um perfil RAPD combinado exclusivo, porém este perfil

apresentou elevada similaridade com os perfis R45 e R46, fazendo parte do "cluster" IIa.

As 252 cepas de *L. monocytogenes* foram sorotipadas com os antissoros O tipos 1 e 4. Destas, 189 (75,0%) pertenceram ao sorogrupo 1 e 63 (25,0%) ao sorogrupo 4. Cepas pertencentes a ambos sorogrupos foram encontradas em amostras de produto, superfícies e ambiente na maior parte das etapas do processamento – incluindo matéria-prima e "nuggets" embalados e estocados. Considerando-se somente as 128 amostras de produto, 100 (78,1%) pertenciam ao sorogrupo 1 e 28 (21,9%) ao sorogrupo 4. As seis cepas isoladas de manipulador (cepas 220 a 225) pertenciam ao sorogrupo 1.

Estes resultados estão em conformidade com os apresentados por outros pesquisadores (COX et al., 1999; JAY, 1996; SCHLECH, 1996) que relatam o predomínio de cepas do sorogrupo 1 em amostras de alimentos. Estes autores apontam ainda que *L. monocytogenes* do sorogrupo 4 está mais relacionada a surtos e sugerem que produtos de frango desempenham um papel relativamente menor na listeriose de origem alimentar. No entanto neste estudo foram encontradas cepas do sorogrupo 4 em amostras de "nuggets" já embalados e prontos para distribuição (cepas 117, 120, 126 e 128), demonstrando a importância deste produto como possível veículo de infecção por *L. monocytogenes*.

A combinação dos resultados obtidos com a sorologia e o RAPD permitiu separar as 252 cepas de *L. monocytogenes* em sete subtipos: A a G (tabela 6). As cepas do "cluster" Ia pertencem ao sorogrupo 1 e os outros três "clusters" – Ib, IIa e IIb – apresentaram cepas de ambos os sorogrupos. Entretanto vale destacar que das 106 cepas do "cluster" Ib, apenas uma pertencia ao sorogrupo 4, e das nove cepas do "cluster" IIb apenas uma pertencia ao sorogrupo 1. Quando se calculou o índice de discriminação *D* para os resultados combinados de RAPD e sorologia, que geraram os sete

subtipos, o valor encontrado foi 0,728. Este valor, apesar de inferior aos calculados para os perfis RAPD, foi considerado suficiente para a avaliação da correlação entre os subtipos e sua distribuição na planta processadora.

Apesar de neste estudo o RAPD ter permitido a diferenciação entre cepas de um mesmo sorogrupo, para o perfil RAPD combinado R12 isso não foi possível (figura 9). Estes dados estão de acordo com aqueles reportados por MAZURIER, WERNARS (1992), LAWRENCE et al. (1993) e WAGNER et al. (1996) que afirmam ser o RAPD eficiente para a separação de sorogrupos – especialmente dos sorotipos 1/2a e 1/2b – porém encontraram também cepas de sorogrupos diferentes em um mesmo grupo RAPD. Por outro lado, O'DONOGHUE et al. (1995) relatam ter conseguido separar cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em diferentes perfis RAPD, usando seis "primers". DESTRO et al. (1996) também encontraram perfis RAPD incluindo cepas de diferentes sorotipos. Porém, ao combinar os resultados de dois métodos de subtipagem – RAPD e PFGE – os subtipos gerados incluíram apenas cepas de sorotipos diferentes.

A distribuição dos sete subtipos nas diversas etapas do processamento e nos diferentes tipos de amostra pode ser vista na tabela 7.

Tabela 3. Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 17 perfis RAPD gerados com o "primer" M13.

Perfil M13	Cepas ^a	Total de cepas
m01	5 7 9 14 16 29 31 33 40 42 49 54 60 73 80 81 82 95 104 112 122 124 131 136 137 142 147 156 160 164 167 171 192 218	34
m02	135 140 144 178 183	5
m03	18 20 26 28	4
m04	98	1
m05	6 15 23 24 27 30 35 36 39 50 51 52 56 62 69 79 84 91 99 106 109 113 114 116 118 132 149 155 162 176 180 181 184 186 193 196 197 198 201 202 211 212 213 219 232	45
m06	3 13 34 63 64 110 119 121 123 133 138 150 157 158 185 203 208 214 215 216 248 249 250 251	24
m07	1 2 8 11 12 19 22 45 48 58 59 68 71 74 76 77 86 88 103 105 111 129 130 145	24
m08	173 217 220 221 222 223 224 225 229 243	10
m09	205	1
m10	153 188	2
m11	32 37 53 61 65 66 67 70 78 85 92 93 94 100 101 102 107 108 115 117 120 125 126 127 141 143 146 151 152 154 161 163 166 168 169 170 172 174 182 194 195 204 206 207 209 210 226 227 228 236 237 240 241 244 245 246 247 252	58
m12	190 191 199	3
m13	200 233 234 235 238	5
m14	4 10 17 21 41 44 47 57 72 75 83 128 148 159 165 175 177 179	18
m15	139	1
m16	46 87 90 96 134 187 189 230 231 239 242	11
m17	25 38 43 55 89 97	6

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Tabela 4. Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 23 perfis RAPD gerados com o "primer" UBC155.

Perfil UBC155	Cepas ^a	Total de cepas
u01	27 99 106 132 149 155 176 180 184 186 193 196 197 198 201 202 211 212 213 232	20
u02	9 14 16 18 20 26 28 40 42 49 60 73 80 81 82 98 112 124 131 137 140 142 147 156 160 164 218	27
u03	104 122	2
u04	31 33 54 95 135 136 144 167 171 178 183 192	12
u05	59 64 69 71 76 77 173 181 203 208 214 215 216 219	14
u06	3 12 13 34 48 63 68 74 88 185 205 217 220 221 222 223 224 225 229 243 248 249 250 251	24
u07	153 188	2
u08	8 103 105 110 111 119 121 123 129 130 133 138 145 150 157 158	16
u09	5 7 29	3
u10	1 2 6 11 15 19 22 23 24 30 35 36 39 45 50 51 52 56 58 62 79 84 86 91 109 113 114 116 118 162	30
u11	41 46 53 65 66 67 87 93 96 141 187 207 228 230 231 242 247	17
u12	37 70 100 101 102 115 125 143 146 161 166 182 209 210	14
u13	127 134 151 154 169 170 189 239	8
u14	38 120 206	3
u15	25 32 43 61 78 90 92 94 107 126 152 163 191	13
u16	168 190 199	3
u17	44 57 75 117 128 139 148 159 165 172 174 175 177 179	14
u18	226 227 233 234 235 236 237 238 240 241 244 252	12
u19	97 194 195 200 204	5
u20	245 246	2
u21	55	1
u22	10 17 21 47 72 83 85 108	8
u23	4 89	2

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Tabela 5. Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os 50 perfis RAPD combinados obtidos com os "primers" M13 e UBC155.

Perfil M13	Perfil UBC155	Perfil combinado	Cepas ^a	Total de cepas
m01	u02	R01	9 14 16 40 42 49 60 73 80 81 82 112 124 131 137 142 147 156 160 164 218	21
m02	u02	R02	140	1
m01	u03	R03	104 122	2
m01	u04	R04	31 33 54 95 136 167 171 192	8
m02	u04	R05	135 144 178 183	4
m03	u02	R06	18 20 26 28	4
m04	u02	R07	98	1
m01	u09	R08	5 7 29	3
m05	u01	R09	27 99 106 132 149 155 176 180 184 186 193 196 197 198 201 202 211 212 213 232	20
m05	u10	R10	6 15 23 24 30 35 36 39 50 51 52 56 62 79 84 91 109 113 114 116 118 162	22
m07	u10	R11	1 2 11 19 22 45 58 86	8
m05	u05	R12	69 181 219	3
m06	u05	R13	64 203 208 214 215 216	6
m07	u05	R14	59 71 76 77	4
m06	u06	R15	3 13 34 63 185 248 249 250 251	9
m07	u06	R16	12 48 68 74 88	5
m08	u05	R17	173	1
m08	u06	R18	217 220 221 222 223 224 225 229 243	9
m09	u06	R19	205	1
m06	u08	R20	110 119 121 123 133 138 150 157 158	9
m07	u08	R21	8 103 105 111 129 130 145	7
m10	u07	R22	153 188	2
m11	u20	R23	245 246	2
m11	u15	R24	32 61 78 92 94 107 126 152 163	9
m11	u16	R25	168	1

continua

continuação

Perfil M13	Perfil UBC155	Perfil combinado	Cepas ^a	Total de cepas
m12	u15	R26	191	1
m12	u16	R27	190 199	2
m11	u11	R28	53 65 66 67 93 141 207 228 247	9
m11	u12	R29	37 70 100 101 102 115 125 143 146 161 166 182 209 210	14
m11	u13	R30	127 151 154 169 170	5
m11	u14	R31	120 206	2
m11	u17	R32	117 172 174	3
m11	u18	R33	226 227 236 237 240 241 244 252	8
m11	u19	R34	194 195 204	3
m11	u22	R35	85 108	2
m13	u18	R36	233 234 235 238	4
m13	u19	R37	200	1
m17	u19	R38	97	1
m17	u14	R39	38	1
m16	u15	R40	90	1
m17	u15	R41	25 43	2
m14	u11	R42	41	1
m16	u11	R43	46 87 96 187 230 231 242	7
m16	u13	R44	134 189 239	3
m14	u17	R45	44 57 75 128 148 159 165 175 177 179	10
m15	u17	R46	139	1
m14	u22	R47	10 17 21 47 72 83	6
m14	u23	R48	4	1
m17	u21	R49	55	1
m17	u23	R50	89	1

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

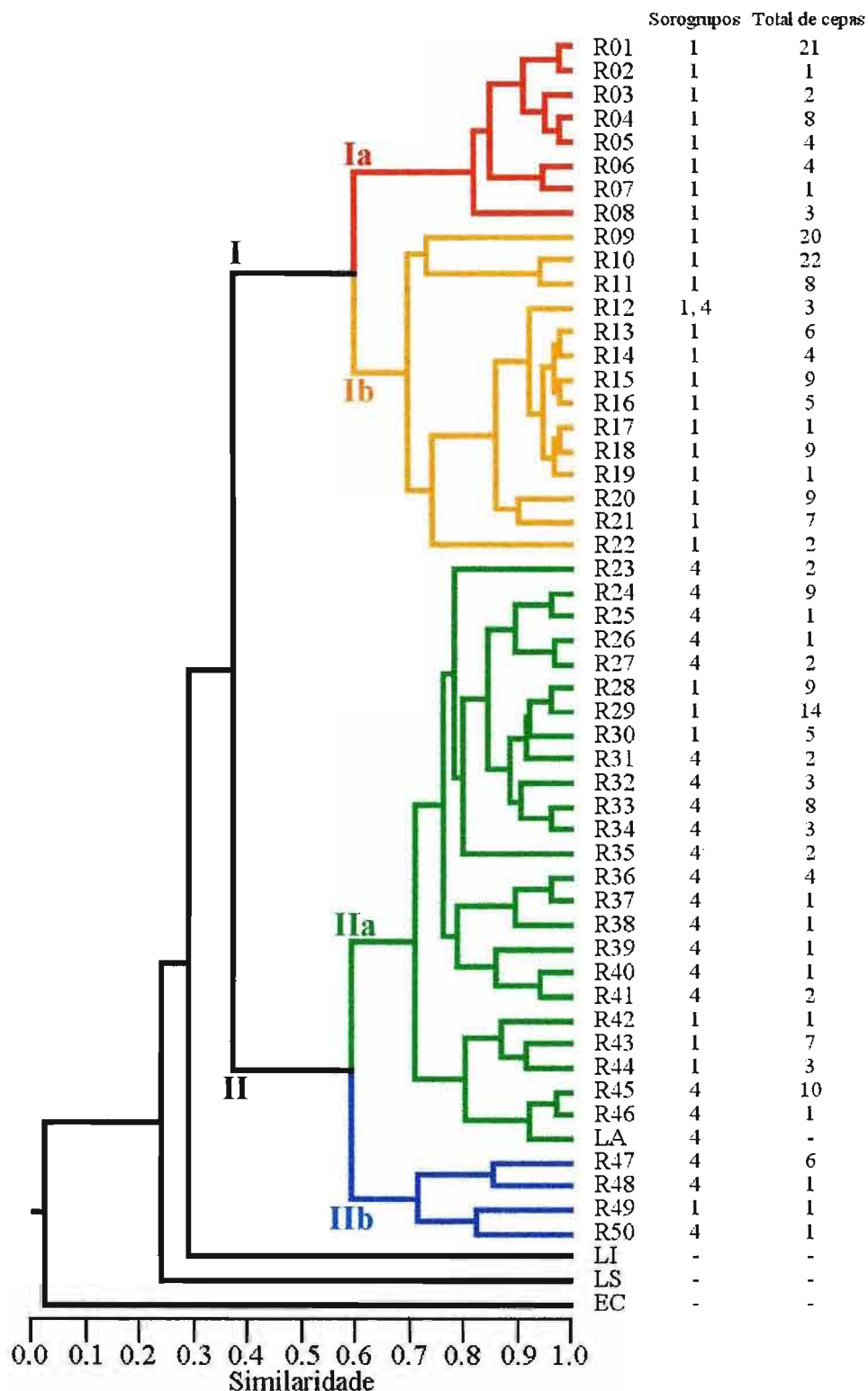


Figura 9. Representação da relação genética entre os 50 perfis RAPD combinados obtidos para as cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango (R01 a R50), *L. monocytogenes* Scott A (LA), *L. innocua* (LI), *L. seeligeri* (LS) e *E. coli* (EC).

Tabela 6. Distribuição das 252 cepas de *L. monocytogenes* isoladas em uma linha de processamento industrial de "nuggets" congelados de frango, conforme os sete subtipos formados pela combinação dos resultados da sorologia e do RAPD.

Subtipo	"Cluster" RAPD	Sorogrupo	Cepas ^a	Total de cepas
A	Ia	1	5 7 9 14 16 18 20 26 28 29 31 33 40 42 49 54 60 73 80 81 82 95 98 104 112 122 124 131 135 136 137 140 142 144 147 156 160 164 167 171 178 183 192 218	44
B	Ib	1	1 2 3 6 8 11 12 13 15 19 22 23 24 27 30 34 35 36 39 45 48 50 51 52 56 58 59 62 63 64 68 69 71 74 76 77 79 84 86 88 91 99 103 105 106 109 110 111 113 114 116 118 119 121 123 129 130 132 133 138 145 149 150 153 155 157 158 162 173 176 180 181 184 185 186 188 193 196 197 198 201 202 203 205 208 211 212 213 214 215 216 217 220 221 222 223 224 225 229 232 243 248 249 250 251	105
C	Ib	4	219	1
D	IIa	1	37 41 46 53 65 66 67 70 87 93 96 100 101 102 115 125 127 134 141 143 146 151 154 161 166 169 170 182 187 189 207 209 210 228 230 231 239 242 247	39
E	IIa	4	25 32 38 43 44 57 61 75 78 85 90 92 94 97 107 108 117 120 126 128 139 148 152 159 163 165 168 172 174 175 177 179 190 191 194 195 199 200 204 206 226 227 233 234 235 236 237 238 240 241 244 245 246 252	54
F	IIb	1	55	1
G	IIb	4	4 10 17 21 47 72 83 89	8

^a Consultar tabelas 1 e 2 para identificação da origem das cepas.

Tabela 7. Distribuição dos sete subtipos de *L. monocytogenes* (A a G), obtidos pela combinação dos resultados da sorologia e do RAPD, nas diferentes etapas do processamento industrial de "nuggets" congelados de frango.

Etapa do processamento	Subtipos ^a das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de amostras de			
	produto	superfície	ambiente	manipulador
Matéria-prima	ABG			
Inspeção		AB		
Mistura com salmoura	ABG	ABDE	BDE	
"Picagem" de carne	ABE	ABDE		
Resfriamento	ABDE	ABDE	BD	
Formatação	ABDEFG	ABE	BDE	
Empanagem n° 1		BD		
Empanagem n° 2	ABDEG	ABC		
Tempura		BDE		B
Empanagem n° 3	ABEG	B		
Pré-fritura	BDEG	E		
Congelamento	ABDE	DE		
Deteccção de metal		BDE		
Reidratação	ABDE			
Inspeção final		BDE		
Embalagem	ABDE	BE		
Estocagem	ABDE			

^a Consultar tabela 6 para identificação das cepas pertencentes a cada subtipo.

Pela análise da tabela 7 constata-se que a matéria-prima abriga cepas de três subtipos (A, B e G), sendo os dois primeiros subtipos pertencentes ao "cluster" I. O subtipo C é o único do "cluster" I não detectado na matéria prima, porém, apenas uma cepa (nº 219) pertencia a este subtipo (tabela 6) tendo ele sido detectado em apenas um ponto da linha de produção (esteira de empanagem nº 2). Também é interessante destacar que esta cepa é a única do sorogrupo 4 pertencente a este "cluster".

Cepas dos subtipos A e B parecem ser endógenas ao produto, mas contaminam o ambiente e não são eliminadas pelos processos de limpeza e sanificação, passando a fazer parte do ambiente industrial, provavelmente pela formação de biofilmes. Esta não eliminação pode ser decorrente de falhas no processo de higienização ou por serem estas cepas resistentes aos sanificantes empregados.

Uma vez que as cepas destes subtipos estão presentes no produto nas diversas etapas do processamento, até o produto final, fica difícil definir se elas são mais adaptadas ao produto ou se ocorre re-contaminação do mesmo através das superfícies dos equipamentos ou do ambiente.

Deve-se observar a importância da seleção de pelo menos três cepas de cada ponto de amostragem. Dentre as 10 cepas isoladas de matéria-prima foram encontrados três subtipos diferentes de *L. monocytogenes*; e se um número menor de cepas fosse utilizado, os resultados poderiam ser diferentes.

Os subtipos F e G, pertencentes ao "cluster" IIb foram encontrados apenas em amostras de produto e desaparecem após a etapa de congelamento dos "nuggets". Isso leva a supor que as cepas destes subtipos estariam adaptadas ao alimento e seriam mais sensíveis aos tratamentos térmicos aplicados.

Os subtipos D e E, que abrigam cepas do "cluster" IIa, parecem ser adaptados ao ambiente de processamento. Estas cepas foram inicialmente

isoladas de amostras de superfícies de equipamentos e de ambiente na etapa de mistura com salmoura (tabela 7). Já na etapa seguinte ("picagem" da carne) cepas destes subtipos foram isoladas do produto e passaram a ser detectadas em todas as etapas subseqüentes, inclusive no produto final. Pode-se supor que por serem cepas adaptadas ao estresse ambiental elas também apresentem uma melhor adaptação às condições de processamento como fritura, congelamento, etc. Sabe-se que o estresse subletal provocado por um agente (ex. calor) leva ao desenvolvimento de resistência a outros agentes (ex. pH). Isto pode ocorrer porque os genes responsáveis pela codificação das proteínas de resistência estão em "clusters" e são regulados por um mesmo promotor. Ou seja, pela ativação de um destes genes, os outros são ativados em um "efeito cascata". (DORMAN, 1994).

Todas as cepas isoladas de manipulador (cepas 220-225) apresentaram o mesmo perfil RAPD combinado (perfil R18) (tabela 5) e foram alocadas no subtipo B juntamente com cepas provenientes do produto, do ambiente e de equipamentos (tabela 6). Uma vez que este subtipo já está presente na matéria-prima logo na sua chegada à indústria, pode-se supor que este manipulador esteja se contaminando no ambiente de processamento. Isto é possível uma vez que o uso de luvas não é garantia de prevenção de contaminação (FENDLER et al., 1998). Neste ponto da linha de produção ocorre o preparo da tempura – a massa que envolve os "nuggets" – não havendo contato direto deste manipulador com a carne de frango. Uma das hipóteses levantadas por RODRIGUES (1999) para a contaminação deste manipulador está relacionada ao fato do balde usado para o transporte da tempura ficar apoiado diretamente no piso. Esta hipótese não pôde ser efetivamente comprovada, mas é reforçada pelo fato de se haver encontrado cepas deste mesmo subtipo B contaminando o ambiente (piso e ralos) em etapas anteriores.

Não há como propor uma forma única para a diminuição ou eliminação da contaminação do produto por *L. monocytogenes*, uma vez que a presença do microrganismo está generalizada na linha de produção avaliada. A solução seria a implementação inicial de boas práticas de produção e, a seguir, da implantação do sistema de análise de risco e pontos críticos de controle (HACCP).

Este trabalho deve ser iniciado com a busca de fornecedores de matéria-prima com menor carga de patógeno, uma vez que se verificou que a matéria-prima já chega à indústria contaminada com subtipos resistentes às condições de processamento.

Outro ponto a ser melhorado na empresa em questão relaciona-se aos cuidados com limpeza e sanificação, uma vez que foram encontradas cepas de *L. monocytogenes* adaptadas a superfícies de equipamentos e ambiente e que depois são encontradas no alimento. A remoção dos biofilmes formados deve ser buscada e, com técnicas adequadas de limpeza e sanificação, sua formação posterior pode ser evitada.

Somente após a solução destes problemas é que se pode pensar na implementação de um plano HACCP, que irá garantir o fornecimento ao consumidor de produto de baixo risco. Por se tratar de um alimento que ainda será submetido a tratamento térmico antes do consumo a ausência de *L. monocytogenes* no produto não é necessária, mas a empresa deve buscar a redução nos níveis de contaminação para evitar deixar nas mãos do consumidor final a responsabilidade pela segurança do alimento.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e a discussão apresentada no presente trabalho concluiu-se que:

- A matéria-prima chega à planta processadora portando subtipos de *L. monocytogenes* que são resistentes às condições de processamento e capazes de colonizar o ambiente.

- Os equipamentos e o ambiente contribuem para a contaminação do produto, possibilitando a introdução no mesmo de cepas de *L. monocytogenes* de subtipos não encontrados na matéria-prima.

- Manipuladores não introduzem novos subtipos de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento ou no produto, porém podem estar contribuindo para contaminação cruzada entre estes.

- A contaminação do produto por cepas presentes no ambiente de processamento evidencia a necessidade de melhoria no processo de higienização. Medidas como aumento da frequência de limpeza e sanificação, substituição de sanificantes, por exemplo, devem ser avaliadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLERBERGER, F., DIERICH, M.P., GRUNDMANN, H., HARTUNG, D., BANNERMAN, E., BILLE, J. Typing of Austrian *Listeria monocytogenes* isolates by automated laser fluorescence analysis of randomly amplified polymorphic DNA. **Zentralbl. Bakteriol.**, Jena, v.286, n.1, p.33-40, 1997.
- BILLE, J., ROCOURT, J. WHO international multicenter *Listeria monocytogenes* subtyping study - rationale and set-up of the study. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.251-262, 1996.
- BROSCH, R., BRETT, M., CATIMEL, B., LUCHANSKY, J.B., OJENIYI, B., ROCOURT, J. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.343-355, 1996.
- CAUGANT, D.A., ASHTON, F.E., BIBB, W.F., BOERLIN, P., DONACHIE, W., LOW, C., GILMOUR, A., HARVEY, J., NØRRUNG, B. Multilocus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: results of an international comparative study. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.301-311, 1996.
- COX, N.A., BAILEY, J.S., RYSER, E.T. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in poultry and egg products. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H., eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 738p.

- DESTRO, M.T., LEITÃO, M.F.F., FARBER, J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n.2, p.705-711, 1996.
- DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, New York, v.26, p.297-302, 1945.
- DILLON, J.-A.R., BEZANSON, G.S., YEUNG, K.-H. Basic Techniques. In: DILLON, J.-A.R., NASIM, A., NESTMANN, E.R., eds. **Recombinant DNA methodology**. New York: John Wiley, 1985. p.13-30.
- DODD, C.E.R. The application of molecular typing techniques to HACCP. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.5, p.160-164, 1994.
- DORMAN, C.J. **Genetics of bacterial virulence**. Oxford: Blackwell, 1994. p.166-203.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.
- FARBER, J.M., ADDISON, C.J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.77, p.242-250, 1994.
- FARBER, J.M., PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.55, n.3, p.476-511, 1991.
- FENDLER, E.J., DOLAN, M.J., WILLIAMS, R.A., PAULSON, D.S. Handwashing and glowing for food protection. Part II. Effectiveness. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.18, n.12, p.824-829, 1998.
- GERNER-SMIDT, P., BOERLIN, P., ISCHER, F., SCHMIDT, J. High-frequency endonuclease (REA) typing: results from the WHO collaborative study group on subtyping of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.313-324, 1996.

- GIOVANNACCI, I., RAGIMBEAU, C., QUEGUINER, S., SALVAT, G., VENDEUVRE, J.-L., CARLIER, V., ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.53, n.2/3, p.127-140, 1999.
- GRAVESEN, A., JACOBSEN, T., MØLLER, P.L., HANSEN, F., LARSEN, A.G., KNØCHEL, S. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.57, n.1/2, p.43-51, 2000.
- HAYNES, K.A., SULLIVAN, D.J., COLEMAN, D.C., CLARKE, J.C.K., EMILIANUS, R., ATKINSON, C., CANN, K.J. Involvement of multiple *Cryptococcus neoformans* strains in a single episode of cryptococcosis and reinfection with novel strains in recurrent infection demonstrated by random amplification of polymorphic DNA and DNA fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.1, p.99-102, 1995.
- HUNTER, P.R., GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.
- JAY, J.M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.209-214, 1996.
- JERŠEK, B., TCHERNEVA, E., RIJPENS, N., HERMAN, L. Repetitive element sequence-based PCR for species and strain discrimination in the genus *Listeria*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.23, p.55-60, 1996.
- KERR, K.G., KITE, P., HERITAGE, J., HAWKEY, P.M. Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *Listeria monocytogenes* by random amplification of polymorphic DNA. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.58, n.6, p.609-613, 1995.

- KIDD, K.K., RUANO, G. Optimizing PCR. In: MCPHERSON, M.J., HAMES, B.D., TAYLOR, G.R., eds. **PCR 2: a practical approach**. New York: Oxford University Press, 1995. p.1-22.
- LAM, T.J.G.M., LIPMAN, L.J.A., SCHUKKEN, Y.H., GAASTRA, W., BRAND, A. Epidemiological characteristics of bovine clinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* studied by DNA fingerprinting. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v.57, p.39-42, 1996.
- LAWRENCE, L.M., GILMOUR, A. Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.61, n.6, p.2139-2144, 1995.
- LAWRENCE, L.M., HARVEY, J., GILMOUR, A. Development of a random amplified polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.9, p.3117-3119, 1993.
- LEWIN, B. **Genes VI**. New York: Oxford University Press, 1998. p.51-70.
- LIN, A.W., USERA, M.A., BARRET, T.J., GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.4, p.870-876, 1996.
- MAFU, A.A., ROY, D., GOULET, J., MAGNY, P. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, p.742-746, 1990.
- MATTHEWS, K.R., OLIVER, S.P. Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.57, n.6, p.486-489, 1994.

- MAZURIER, S.-I., VAN-DE-GIESSEN, A., HEUVELMAN, K., WERNARS, K.
RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.14, n.6, p.260-262, 1992.
- MAZURIER, S.-I., WERNARS, K. Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. **Res. Microbiol.**, Paris, v.143, p.499-505, 1992.
- McLAUCHLIN, J., AUDURIER, A., FROMMELT, A., GERNER-SMIDT, P., JACQUET, C., LOESSNER, M.J., VAN DER MEE-MARQUET, N., ROCOURT, J., SHAH, S., WILHELMS, D. WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.289-299, 1996.
- MORAIS, P.V., MESQUITA, C., ANDRADE, J.L., COSTA, M.S.da
Investigation of persistent colonization by *Pseudomonas aeruginosa*-like strains in a spring water bottling plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.63, n.3, p.851-856, 1997.
- NIEDERHAUSER, C., HÖFELEIN, C., ALLMANN, M., BURKHALTER, P., LÜTHY, J., CANDRIAN, U. Random amplification of polymorphic bacterial DNA: evaluation of 11 oligonucleotides and application to food contaminated with *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.77, p.574-582, 1994.
- O'DONOGHUE, K., BOWKER, K., McLAUCHLIN, J., REEVES, D.S., BENNETT, P.M., MACGOWAN, A.P. Typing of *Listeria monocytogenes* by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.27, p.245-252, 1995.
- PALUMBO, S.A., WILLIAMS, A.C. Effect of temperature, relative humidity and suspending menstrua on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.53, p.377-381, 1990.

- PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A., eds. Recombinant DNA technology. In: PRESCOTT, L.M., HARLEY, J.P., KLEIN, D.A., eds. **Microbiology**. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 1996. p.305-329.
- ROCOURT, J., COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P., BEUCHAT, L.R., MONTVILLE, T.J., eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM Press, 1997. p.337-352.
- RODRIGUES, D.A. ***Listeria sp e Listeria monocytogenes em indústria processadora de nuggets de frango: estudo de ocorrência e avaliação de metodologias de análise***. São Paulo, 1999. 104p. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
- RYSER, E.T., MARTH, E.H. ***Listeria, listeriosis and food safety***. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., eds. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3, p.B.23, B.24, E.5.
- SCHLECH, W.F. Overview of listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.7, n.4/5, p.183-186, 1996.
- SCHÖNBERG, A., BANNERMAN, E., COURTIEU, A.L., KISS, R., MCLAUCHLIN, J., SHAH, S., WILHELMS, D. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.279-287, 1996.
- SILVA, W.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite**. São Paulo, 1998. 105p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).

- SNEATH, P.H.A, SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.
- SWAMINATHAN, B., HUNTER, S.B., DESMARCHELIER, P.M., GERNER-SMIDT, P., GRAVES, L.M., HARLANDER, S., HUBNER, R., JACQUET, C., PEDERSEN, B., REINECCIUS, K., RIDLEY, A., SAUNDERS, N.A., WEBSTER, J.A. WHO-sponsored international collaborative study to evaluate methods for subtyping *Listeria monocytogenes*: restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis using ribotyping and Southern hybridization with two probes derived from *L. monocytogenes* chromosome. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.263-278, 1996.
- SWAMINATHAN, B., MATAR, G.M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J., eds. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington: ASM, 1993. p.26-50.
- THOMAS, C.J. PCR, RAPD, RFLP and PFGE methods for screening isolates of *Listeria monocytogenes*. In: ARNOLD, G.J., SUTHERLAND, P.S., SZABO, E.A., eds. **Listeria methods workshop manual: detection, identification and typing of *Listeria monocytogenes* in foods**. Perth: Promaco Conventions Pty, 1995. p.84-100. (International Symposium on Problems of Listeriosis, 12, Perth, 1995)
- WAES, G. Development of quick, specific and sensitive identification methods for *Listeria monocytogenes*. [Online]. Available: <http://www.belspo.be/fedra/bib/e-a2.htm> [May 26, 1998].
- WAGNER, M., MADERNER, A., BRANDL, E. Development of a multiple primer RAPD assay as a tool for phylogenetic analysis in *Listeria* spp. Strains isolated from milkproduct associated epidemics, sporadic cases of listeriosis and dairy environments. **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.52, p.29-37, 1999.

- WAGNER, M., MADERNER, A., BRANDL, E. Random amplification of polymorphic DNA for tracing and molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* contamination in a cheese plant. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.59, n.4, p.384-389, 1996.
- WANG, G., WHITTAM, T.S., BERG, C.M., BERG, D.E. RAPD (arbitrary primer) PCR is more sensitive than multilocus enzyme electrophoresis for distinguishing related bacterial strains. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.21, n.25, p.5930-5933, 1993.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WERNARS, K., BOERLIN, P., AUDURIER, A., RUSSEL, E.G., CURTIS, G.D.W., HERMAN, L., VAN DER MEE-MARQUET, N. The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Int. J. Food Microbiol.**, Shannon, v.32, n.3, p.325-341, 1996.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Protocol for the 1997 WHO RAPD collaborative study.** s.l.: WHO, 1997. 5p. [Comunicação Pessoal].
- YOUNG, K.A., POWER, E.G.M., DRYDEN, M.S., PHILLIPS, I. RAPD typing of clinical isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.18, p.86-89, 1994.