

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Débora Alves Ferreira da Silva

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE *Listeria monocytogenes*  
SOROTIPO 1/2a POR “MULTI-VIRULENCE-LOCUS SEQUENCE TYPING”  
(MVLST)**

Rio de Janeiro

2018

Débora Alves Ferreira da Silva

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE *Listeria monocytogenes*  
SOROTIPO 1/2a POR “MULTI-VIRULENCE-LOCUS SEQUENCE TYPING”  
(MVLST)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dr. Ivano Raffaele Victorio de  
Filippis Capasso e Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Silva, Débora Alves Ferreira da

Estudo da diversidade genética de estirpes de *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a por “Multi-Virulence-Locus Sequence Typing” (MVLST). / Débora Alves Ferreira da Silva. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2018.

70 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadores: Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso e Dr. Marcelo Luiz Lima Brandão

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Alimentos. 3. Epidemiologia molecular. 4. Sorogrupo. I. Título

Débora Alves Ferreira da Silva

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE ESTIRPES DE *Listeria monocytogenes*  
SOROTIPO 1/2a POR “MULTI-VIRULENCE-LOCUS SEQUENCE TYPING”  
(MVLST)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Célia Maria C. Pereira Araujo Romão (Doutora)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

---

Beatriz Meurer Moreira (Doutora)

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

---

Deyse Christina Vallim da Silva (Doutora)

Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz)

**ORIENTADORES**

---

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

---

Marcelo Luiz Lima Brandão (Doutor)

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz)

Aos meus pais Denize e Francisco e minha  
irmã Juliana.

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação e ao INCQS pela oportunidade de realização deste curso.

Ao Setor de Bactérias de Referência do Laboratório de Microrganismos de Referência do INCQS/Fiocruz pela provisão das cepas de referência.

Aos companheiros do Setores de Meios de Cultura e Esterilização pela atenção e eficiência ao atendimento dos pedidos para realização deste trabalho.

À plataforma PDTIS de sequenciamento do IOC/Fiocruz pela realização de determinadas etapas do sequenciamento das amostras.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC/Fiocruz pelas cepas cedidas para realização deste estudo.

Aos meus orientadores Dr. Ivano Filippis e Dr. Marcelo Luiz Brandão pela orientação e contribuição no meu aprendizado.

A Dra Cátia Chaia por todo o suporte oferecido e por estar sempre disposta a ajudar.

A Dra Kátia Leandro pelo carinho e incentivo dados ao longo do curso.

A Deus por ter me dado forças para alcançar minhas vitórias.

Aos meus pais por terem me criado para que eu fosse atrás dos meus sonhos e por me incentivarem a buscar ser sempre um ser humano melhor.

A minha irmã por todo o incentivo e torcida.

Aos meus familiares por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos de infância, colégio e faculdade pela amizade e por estarem sempre presentes e me incentivando a crescer.

Aos amigos do Setor de Alimentos e aos que nele estiveram presentes: Carla Rosas, Silvia Lopes, Valéria Medeiros, Carla Trece, Gisele Oliviere, Rodrigo Tavares, Maria Luiza Cabral, Cátia Cardoso, Luiza Vasconcellos, Ingrid Camelo e Pablo Coimbra por me incentivarem e me ajudarem sempre que precisei, por terem me proporcionado momentos maravilhosos dentro do laboratório.

“ - A evolução criou toda a vida senciente neste planeta usando somente uma ferramenta... O erro. Você é produto de trilhões deles. ”

(Westworld – Robert Ford)

## RESUMO

*Listeria monocytogenes* é um patógeno oportunista e está entre as principais causas de morte por doenças transmitidas por alimentos. Sua manifestação clínica é conhecida como listeriose e suas características de resistência ao congelamento, secagem e calor são fatores de risco para o consumo de alimentos malcozidos ou crus, por indivíduos dos grupos de risco (idosos, gestantes e imunocomprometidos). Com o aumento da incidência de casos relacionados ao sorotipo 1/2a em várias partes do mundo, torna-se importante desenvolver estudos epidemiológicos de cepas circulantes isoladas de alimentos no Brasil. O objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade genética de estirpes de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a isoladas de alimentos e de amostras clínicas no Brasil pela técnica do *Multi-Virulence-Locus Sequence Typing* (MVLST), possibilitando correlacionar o potencial patogênico dos isolados com clones epidêmicos (EC) e cepas patogênicas isoladas em outras regiões do mundo. Um total de 53 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a foram avaliadas neste estudo, sendo três cepas de origem clínica e 50 cepas isoladas de alimentos. Foi realizada a tipificação das cepas pelo sequenciamento dos genes *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* e *prfA*. As 53 cepas foram agrupadas em 10 *Virulence Type* (VT), sendo identificados sete já descritos no banco de dados e três VT novos. Foi observada uma relação de 5,3 cepas por VT e a técnica do MVLST apresentou um valor de índice discriminatório de 0,698. Dois VT (VT59 e VT14) encontrados foram compatíveis com VT depositados no banco descritos como EC (ECV e ECVIII). O VT184 foi descrito pela primeira vez neste trabalho por possuir uma combinação nova de alelos e os VT185 e VT186 apresentaram novos alelos nos genes *inlB* e *prfA*, respectivamente. A identificação de cinco VT (VT11, VT14, VT45, VT59 e VT68), já associados a casos de listeriose no mundo, em isolados de alimentos prontos para o consumo no Brasil demonstra que estes podem representar um risco para saúde da população, principalmente em indivíduos pertencentes aos grupos de risco. Três VT (VT11, VT59 e VT186) foram identificados em amostras de hemocultura, sendo os VT11 e VT59 também identificados em diferentes classes de alimentos, indicando que estes podem estar atuando como veículo de contaminação para os casos de infecções. Os resultados apontam uma necessidade de ampliar o controle e investigação deste patógeno em casos clínicos e alimentos produzidos e comercializados no território, para que se possa ter real conhecimento da disseminação deste patógeno e medidas preventivas em relação a surtos e casos esporádicos possam ser estabelecidas.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Alimentos. MVLST. Epidemiologia molecular. Sorotipo 1/2a.

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is an opportunistic pathogen and is among the leading causes of death from foodborne illness. Its clinical manifestation is known as listeriosis and its characteristics of resistance to freezing, drying and heat is a risk factor for the consumption of raw foods by individuals of the risk groups (elderly, pregnant and immunocompromised). With the increasing incidence of cases related to serotype 1/2a in several parts of the world, it is important to develop epidemiological studies of circulating strains isolated from food in Brazil. The objective of this study was to evaluate the genetic diversity of strains of *L. monocytogenes* serotype 1/2a isolated from food and clinical samples in Brazil by the Multi-Virulence-Locus Sequence Typing (MVLST) technique, making it possible to correlate the pathogenic potential of the isolates with epidemic clones (EC) and pathogenic strains isolated in other regions of the world. A total of 53 strains of *L. monocytogenes* serotype 1/2a were evaluated in this study being three strains of clinical origin and 50 isolates of food. Strain typing was performed by sequencing the *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* and *prfA* genes. The 53 strains were grouped in 10 Virulence Type (VT), identifying seven already described in the database and three new VTs. A ratio of 5.3 strains was observed per VT and the MVLST technique presented a discriminatory index value of 0.698. Two VT (VT14 and VT59) found were compatible with VT deposited in the bank described as EC (ECV and ECVIII). VT184 was described in this work because it possesses a new allele combination; VT185 and VT186 presented new alleles in the *inlB* and *prfA* genes, respectively. The identification of five VTs (VT11, VT14, VT45, VT59 and VT68) already associated with cases of listeriosis in the world in isolates of ready-to-eat foods in Brazil demonstrates that these can pose a health risk to the population, groups. Three VTs (VT11, VT59 and VT186) were identified in blood culture samples, and VT11 and VT59 were also identified in different classes of foods, indicating that they may be acting as a contamination vehicle for infections. The results point to a need to expand the control and investigate this pathogen in clinical cases and foods produced and marketed in the territory, so that it is possible to have a real knowledge of the dissemination of this pathogen so that preventive measures in relation to outbreaks and sporadic cases can be established.

**Key-words:** *Listeria monocytogenes*. Foods. MVLST. Molecular epidemiology. Sorotype 1/2a.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema da rota de contaminação e desenvolvimento da listeriose.....	17
Figura 2	Patogênese de <i>L. monocytogenes</i> nas células epiteliais intestinais .....	19
Figura 3	Dados divulgados sobre o número de surtos ocorridos entre 2007-2017 por regiões no Brasil.....	21
Figura 4	Microrganismos envolvidos em surtos de DTA no Brasil de 2007 a 2016.....	21
Figura 5	Esquema das etapas da técnica de Multi-Locus Sequence Typing (MLST).....	28
Figura 6	Árvore filogenética Neighbor-Joining com 1.000 bootstrap baseada nas sequências dos seis genes do MVLST concatenados (2.606 pb) das 53 cepas de <i>L. monocytogenes</i> sorotipo 1/2a.....	42
Figura 7	Minimum spanning tree dos VT das 53 cepas de <i>L. monocytogenes</i> avaliadas neste estudo.....	46
Figura 8	Minimum spanning tree dos VT pertencentes ao bando de dados e das 53 cepas de <i>L. monocytogenes</i> avaliadas neste estudo.....	52
Figura 9	Árvore filogenética entre as sequências de genes traduzidos para proteínas de cada VT encontrado neste estudo com as sequências de genes traduzidos para proteínas dos EC descritos no banco. Todas as sequências foram concatenadas para a análise.....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações das cepas utilizadas neste estudo.....	37
Tabela 2	Iniciadores utilizados nas reações da PCR.....	39
Tabela 3	Classificação das cepas por VT.....	43
Tabela 4	Caracterização das 53 cepas de <i>L. monocytogenes</i> obtidos pela técnica do MVLST.....	44
Tabela 5	Análise de sítios de polimorfismo das sequências dos alelos obtidos no sequenciamento dos seis genes de virulência <i>clpP</i> , <i>dal</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> , <i>lisR</i> e <i>prfA</i> .....	50
Tabela 6	Polimorfismo de aminoácidos encontrados nos genes.....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micrometros
<i>abcZ</i>	<i>ABC transporter</i> (Transportados ABC)
Ami	<i>autolysin amidase</i> (Autolisina Amidase)
<i>bglA</i>	<i>beta glucosidase</i>
<i>cat</i>	Catalase
CAC	<i>Codex Alimentarius</i> Comission
CC	<i>Clonal Complex</i> (Complexo Clonal)
clpP	<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic</i> (Protease proteolítica Clp dependente de ATP)
dal	<i>Alanine racemase enzyme</i> (Enzima alanina racemase)
<i>dapE</i>	<i>succinyl diaminopimelate desuccinylase</i>
<i>dat</i>	<i>D-amino acid aminotransferase</i> (Aminotransferase D-aminoácido)
DLV	<i>Double-Locus Variant</i> (Variante de <i>locus</i> duplo)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EC	<i>Epidemic Clone</i> (Clone epidêmico)
FbpA	<i>Fibronectin-binding protein A</i> (Proteína A de ligação à fibronectina)
Gr	Grupo
H	Antígeno flagelar de <i>Listeria monocytogenes</i>
InlA	internalina A
InlB	internalina B
inlC	internalina C
InlJ	internalina J
Lap	<i>Listeria adhesion protein</i> (Proteína de adesão de Listeria)
LapB	<i>Listeria adhesion protein B</i> (Proteína B de adesão de Listeria)
<i>ldh</i>	<i>L-lactate dehydrogenase</i> (L-lactato desidrogenase)
lisR	<i>TCS response regulator</i> (Regulador de resposta TCS)
<i>lhkA</i>	<i>histidine kinase</i> (histidina quinase)
MLST	<i>Multi-Locus Sequence Typing</i>
mM	Milimolar

MST	<i>Minimum spanning tree</i> (Árvore de extensão mínima)
MVLST	<i>Multi-Virulence-Locus Sequence Typing</i>
MP	Minimamente Processada
ng	Nanograma
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
O	Antígeno somático de <i>Listeria monocytogenes</i>
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i> (Electroforese em gel de campo pulsado)
prfA	<i>listeriolysin positive regulatory protein</i> (proteína reguladora positiva de listeriolisina)
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rpm	rotações por minuto
SID	Índice discriminatório de Simpson
Subsp.	Subespécie
SLV	<i>Single-Locus Variant</i> (Variante de único locus)
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Polimorfismos de Nucleotídeo Simples)
spp	Espécies
ST	<i>Sequence Type</i>
STEC	Escherichia coli produtora de toxina shiga
TLV	<i>Triple-Locus Variant</i> (Variante de locus triplo)
TSAYE	<i>Trypticase Soy Broth agar with Yeast Extract</i> (Agar de caldo de soja Trypticase com extrato de levedura)
UFC	Unidades formadoras de colônia
VT	<i>Virulence typing</i>
WGS	<i>Whole genome sequencing</i> (Sequenciamento do genoma total)

## LISTA DE SIGLAS

Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFIA	<i>Canadian Food Inspection Agency</i>
DM	Departamento de Microbiologia
EUA	Estados Unidos da América
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
Lacen	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LMAS	Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes
Mapa	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
RDC	Resolução Da Diretoria Colegiada
Sinan	Sistema de Informação dos Agravos de Notificação
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1	O PATÓGENO <i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
1.1.1	Patogenia de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
<b>1.2</b>	<b>Doenças transmitidas por alimentos .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3</b>	<b>Ocorrência de listeriose no mundo .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4</b>	<b>Ocorrência de listeriose no Brasil .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5</b>	<b>Métodos moleculares aplicados no estudo da diversidade de <i>L. Monocytogenes</i> .....</b>	<b>27</b>
1.5.1	MVLST como alternativa.....	29
<b>1.6</b>	<b>Justificativa .....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Cepas bacterianas</b>	<b>36</b>
<b>3.2</b>	<b>Extração e quantificação de DNA .....</b>	<b>38</b>
<b>3.3</b>	<b>Pesquisa dos genes de virulência .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4</b>	<b>Purificação e sequenciamento dos produtos da PCR.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise de dados .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O PATÓGENO *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli, Ordem Bacillales e família Listeriaceae. Morfologicamente são caracterizados como bacilos Gram-positivos curtos, possuindo de 0,4 µm a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 µm a 2 µm de comprimento. São anaeróbios facultativos, não esporulados e não possuem a capacidade de produzir cápsula. Por possuírem flagelos peritríquios, são móveis a temperatura de 25°C. Bactérias do gênero *Listeria* possuem resistência significativa a condições ambientais, sendo capazes de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura (1 a 45°C), pH de 4,3 a 9,6 e toleram altas concentrações de sais ( $\geq 10\%$ ). Seu genoma apresenta um baixo conteúdo G+C% (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007; TORTORA; FUNKE; CAE, 2017).

O patógeno foi isolado pela primeira vez em 1924 por Murray, Webb e Swann em coelhos, sendo denominado *Bacterium monocytogenes* (MURRAY et al, 1926). Em 1930, Pirie isolou em roedores um microrganismo semelhante ao descrito por Murray e colaboradores (1926) e o nomeou de *Listeria hepatolytica*. Somente em 1940 a nomenclatura atual foi definida e oito anos depois o patógeno foi incluído no Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey (1948) (BREED; MURRAY; HITCHENS, 1948).

Atualmente o gênero possui 19 espécies e quatro subespécies descritas: *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. cornellensis*, *L. denitrificans*, *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. murrayi*, *L. newyorkensis*, *L. riparia*, *L. rocourtae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, e *L. welshmeri* (LIST, 2017). As principais espécies do gênero são: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshmeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*, sendo a *L. monocytogenes* a única considerada como patógeno humano (JAY, 2005; TORTORA; FUNKE; CAE, 2017).

A cepas de *L. monocytogenes* são classificados de acordo com os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (VERA et al, 2013), já tendo sido descrito até o momento 13 sorotipos, que carregam todos os genes de virulência, sendo capazes de causar infecções: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, e 7 (LISTERIA, 2012). Porém, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 98% dos casos de listeriose humana, sendo nos últimos 30 anos os sorotipos 1/2a e 4b mais prevalentes (GILOT; GENICOT; ANDRE, 1996; OJENIYI et al, 1996;

ROCOURT et al, 1996; HOFER; REIS; HOFER, 2006; CRUZ et al, 2014; LOMONACO, NUCERA; FILIPELLO, 2015; YIN et al, 2015).

Os estudos de diferentes métodos de tipificação genética e associações com surtos agruparam os sorotipos inicialmente em três linhagens distintas (I, II e III). Wiedmann e colaboradores (1997) basearam esta divisão em características obtidas pela ribotipagem e perfis de polimorfismos obtidos por RFLP de três genes de virulência (*hly*, *inlA* e *actA*) juntamente com características de origem dos isolados (animal ou humano) e sorotipos. Sendo assim, a linhagem I compreende os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e e foi classificada como possuindo maior potencial patogênico, sendo estes sorotipos os mais envolvidos em surtos. A linhagem II compreende os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e está relacionada a surtos esporádicos. A linhagem III compreende os sorotipos 4a e 4c, que são considerados os sorotipos menos virulentos, que raramente causam infecções em humanos (BHUNIA, 2008; LOMONACO; NUCERA; FILIPELLO, 2015). Posteriormente, a linhagem III foi dividida em três subgrupos: IIIA, IIIB, IIIC. Recentemente, a linhagem IIIB foi reclassificada como uma nova linhagem IV, por apresentar características filogenéticas distintas das outras linhagens (LOMONACO; NUCERA; FILIPELLO, 2015).

Enquanto o sorotipo 4b foi o principal agente dos surtos ocorridos entre 1980 a 2000, uma aparente mudança tem sido observada, com o sorotipo 1/2a, passando a ser o mais frequente, particularmente na Europa e na América do Norte (GILMOUR et al, 2010; JACKSON et al, 2011; SMITH et al, 2011). Marini e colaboradores (2016) observaram um aumento das infecções pelo sorotipo 1/2a nas regiões do centro e norte da Itália durante alguns períodos específicos do ano. Em 2016, Tasara e colaboradores (2016) sequenciaram o genoma de três isolados de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a obtidas de queijos e presunto cozido, que foram responsáveis por surtos entre os anos de 2005 e 2011 na Suíça. Neste mesmo ano em Shanghai na China, Zhang e colaboradores (2016), também isolaram cepas do sorotipo 1/2a de amostras clínicas, evidenciando o aumento de infecções ocasionadas por este sorotipo.

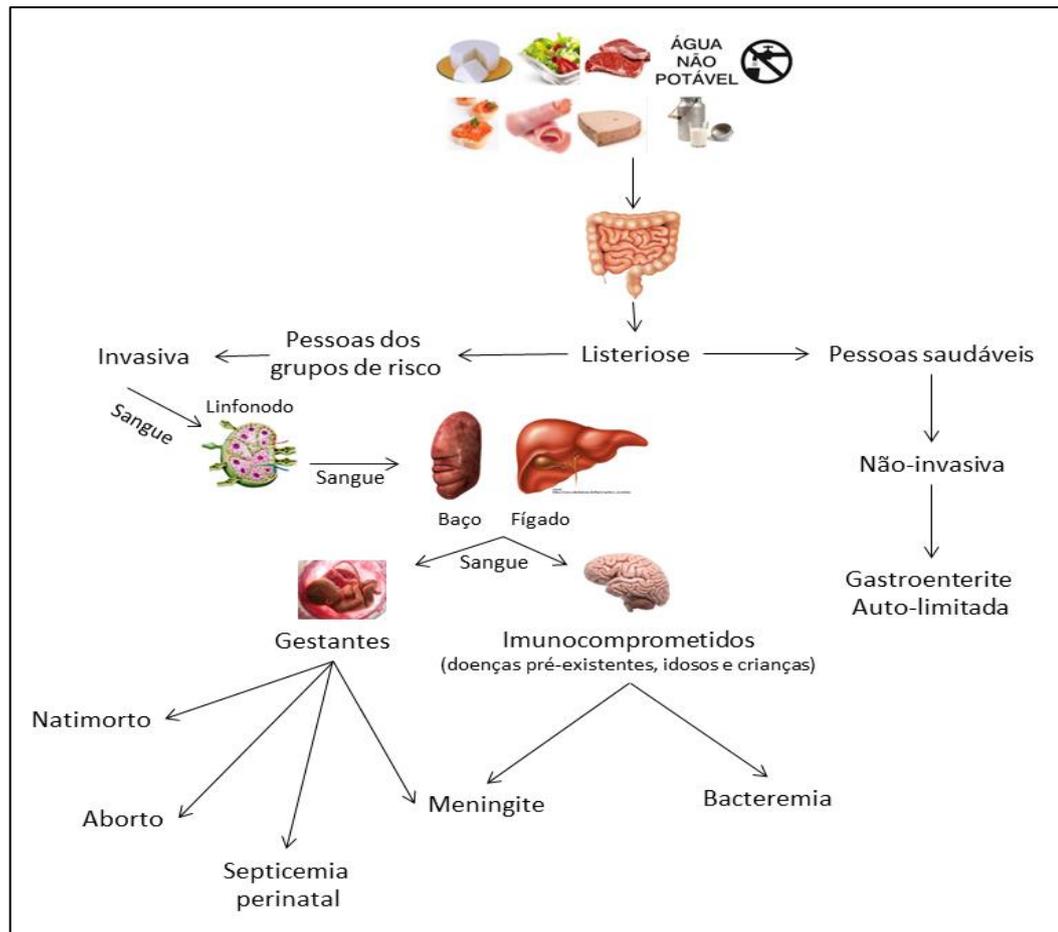
#### 1.1.1 Patogenia de *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* é um patógeno oportunista e está entre as principais causas de morte por doenças transmitidas por alimentos (DTA), com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 12% (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2013; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). A doença gera um impacto significativo na Saúde Pública devido à alta taxa de hospitalização (>95%), morbidade (15-20%) e

morbidade a longo prazo por consequência dos danos ao sistema nervoso (LIU, 2008). Sua manifestação clínica é conhecida como listeriose. O patógeno é capaz de causar infecções no trato gastrointestinal de forma não invasiva. Os casos graves da doença são caracterizados como listeriose invasiva, ocorrendo em pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças e pode se manifestar como: septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical. Em grávidas, a *L. monocytogenes* pode causar febre e outros sintomas não específicos, além de infecção intra-uterina, podendo provocar aborto ou nascimento prematuro (Figura 1). Outras síndromes clínicas podem ocorrer, como: endocardites, lesões granulomatosas no fígado e em outros órgãos, abscessos internos e externos, e lesões cutâneas papulares ou pustulares (JAY, 2005; TORTORA; FUNKE; CAE, 2017).

*L. monocytogenes* pode ser encontrado no solo e água e tem a capacidade de sobreviver e muitas vezes se multiplicar em diversos ambientes (JAY, 2005; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007; TORTORA; FUNKE; CAE, 2017). A bactéria já foi isolada de ambientes de produção e processamento de alimentos, podendo assim contaminar diferentes classes de alimentos prontos para o consumo (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; CARPENTIER; CERF, 2011). A bactéria já foi encontrada em pelo menos 37 espécies de mamíferos, 17 espécies de pássaros e em algumas espécies de peixes e frutos do mar. A sua resistência ao congelamento, secagem e calor é o que torna perigoso o consumo de alimentos malcozidos ou crus por indivíduos pertencentes aos grupos de riscos (idosos, gestantes e imunocomprometidos) (LISTERIA, 2012; JAY, 2005).

Figura 1 - Esquema da rota de contaminação e desenvolvimento da listeriose



Fonte: Do autor, 2018

A gastroenterite provocada por *L. monocytogenes* possui um período de incubação que varia de algumas horas a três dias. Esta forma mais branda da doença pode ter sintomas como febre, dores musculares, náuseas e vômitos e, às vezes, diarreia. Já a forma invasiva da doença pode ter um período de incubação longo, com estimativa de variação de três dias a três meses. Ao invadir o sistema nervoso, pode gerar dores de cabeça, rigidez no pescoço, confusão, perda de equilíbrio e convulsões. Mulheres grávidas podem apresentar sintomas leves ou nenhum sintoma da doença, porém pode levar ao aborto, ou nascimento dos bebês com bacteremia, meningite ou natimorto (JAY, 2005; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007; CARVALHO; SOUSA; CABANES, 2014).

Apesar de sua patogenia ainda ser pouco elucidada, sabe-se que *L. monocytogenes* possui a capacidade de ultrapassar as barreiras patofisiológicas, como o epitélio intestinal, hemato-encefálica e placentária (LECUIT, 2007). A bactéria irá se multiplicar e disseminar pela corrente sanguínea até os gânglios linfáticos. Após essa disseminação, chega ao fígado e baço, e irá se replicar no interior dos macrófagos e das células epiteliais. Quando não há

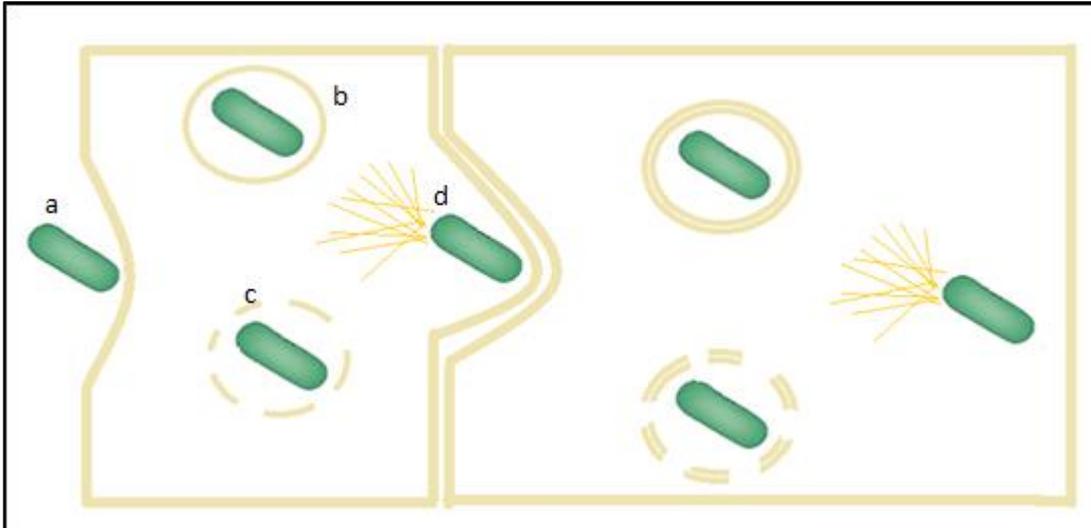
eficiente controle do sistema imune do hospedeiro, a bactéria é capaz de continuar a replicação, ingressar novamente na corrente sanguínea, e migrar para o cérebro ou placenta, causando infecções sistêmicas graves (HAMON; BIERN COSSART, 2006; VERA et al, 2013).

*L. monocytogenes* possui diversos fatores de virulência que são essenciais para o desenvolvimento da listeriose em humanos. Um importante fator de virulência é a adesão celular, sem ele a bactéria não é capaz de se internalizar na célula e não consegue se multiplicar. Várias proteínas estão relacionadas com a adesão celular, destacando-se Lap (adesina), Ami (amidase autolisina), FbpA (proteína de superfície homóloga à proteína de ligação de fibronectina), LapB (proteína que possui papel na adesão e ingresso em células de mamíferos) e internalina J (InlJ) (adesina que se encontra unida covalentemente à peptidoglicana) (HAMON; BIERNE; COSSART, 2006; VERA et al, 2013).

Após adesão, a bactéria necessita invadir a célula hospedeira, e para isso as proteínas internalina A (InlA) e internalina B (InlB) são as principais envolvidas. Essas proteínas são parte de uma superfamília de proteínas chamadas de internalinas e, em *L. monocytogenes*, são conhecidos 41 genes que codificam proteínas deste tipo. As proteínas InlA e InlB são importantes na invasão placentária. Embora ainda não haja muitos estudos, acredita-se que a proteína InlB é importante para os mecanismos de invasão da barreira cerebral. Após a internalização, ocorrem modificações pós-traducionais nos receptores destas proteínas, que são um dos responsáveis pela ativação da cascata de polimerização dos filamentos de actina, importantes para a internalização e invasão da *L. monocytogenes* (HAMON; BIERNE; COSSART, 2006; VERA et al, 2013).

Ao entrar na célula, a bactéria consegue rapidamente lisar o vacúolo fagocítico pela ação da listeriolisina O e das fosfolipases C (Figura 2). Uma vez livre no citosol da célula, a *L. monocytogenes* expressa genes para adquirir os nutrientes necessários para sua multiplicação intracelular. Após sua replicação, a bactéria induz a polimerização dos filamentos de actina, através da expressão da proteína actA que atua como um nucleador de induz a reorganização do citoesqueleto de actina permitindo sua invasão em células vizinhas (PISTOR et al, 1994; HAMON; BIERNE; COSSART, 2006; VERA et al, 2013).

Figura 2 - Patogênese de *L. monocytogenes* nas células epiteliais intestinais



a: *L. monocytogenes* invadindo o tecido; b: Formação do fagossomo; c: Clivagem do fagossomo; d: célula bacteriana se movimenta através dos filamentos de actina para invadir células adjacentes.

Fonte: Do autor, 2018

## 1.2 Doenças transmitidas por alimentos

Por definição, as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são relacionadas à ingestão de alimentos contaminados, seja por microrganismos patogênicos, toxinas microbianas, substâncias químicas ou objetos lesivos (FORSYTHE, 2013). As DTA são consideradas um grande problema de Saúde Pública por possuírem alta morbidade, gerando um grande número de internações que em alguns casos levando o paciente a óbito. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estipula que ocorrem cerca de dois milhões de mortes por ano relacionadas à ingestão de alimentos contaminados. Em 2015, a segurança de alimentos foi tema do Dia Mundial da Saúde, destacando sua importante gravidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2017).

Dentre os alimentos relacionados à DTA, destacam-se os alimentos de origem animal e vegetal, falta de higiene, problemas de conservação e contaminação pós-processamento estão entre as principais causas de contaminação dos alimentos. Existem mais de 250 doenças que são veiculadas por alimentos. De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), a estimativa é que a cada ano, 48 milhões de pessoas fiquem doentes devido a DTA, 128.000 são hospitalizadas e 3.000 vem a óbito. No ano de 2015, os principais patógenos bacterianos associados a DTA que resultaram em óbitos foram, em ordem crescente: *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., e *Escherichia coli*

produtora de Shiga toxina (STEC) O157 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2015).

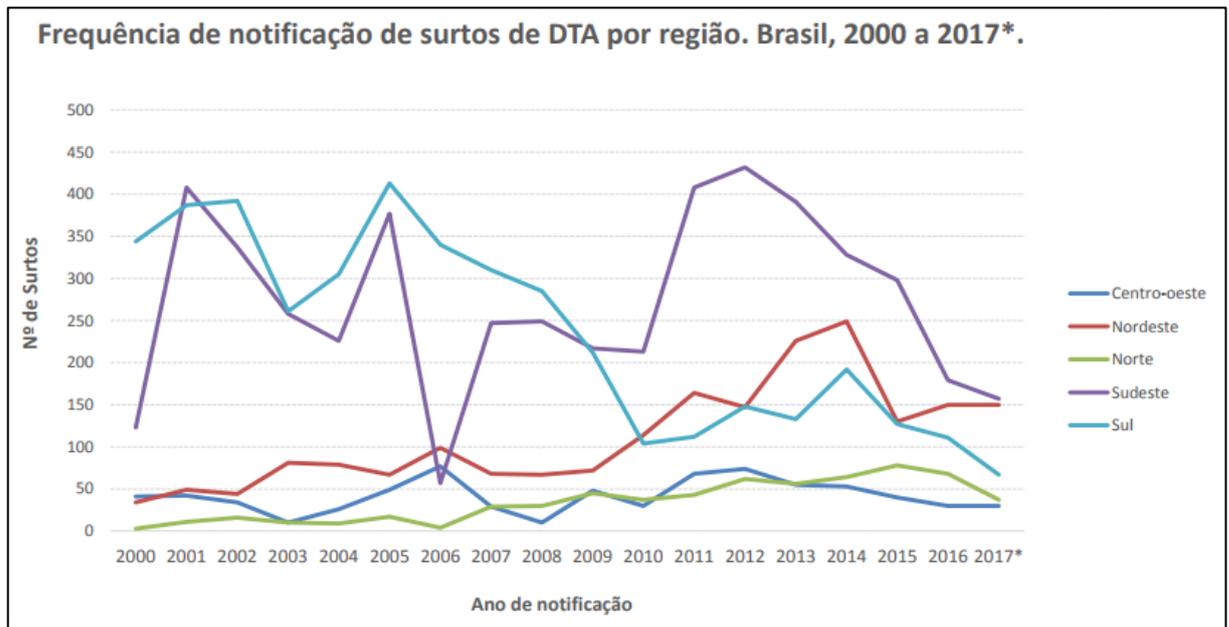
*L. monocytogenes* pode ser encontrada em uma grande variedade de alimentos devido a sua capacidade de sobreviver em altas concentrações de sais e baixa atividade de água. Entre os alimentos normalmente associados encontram-se: leite cru, leite inadequadamente pasteurizado, leite com chocolate, queijos (principalmente os não muito processados), soquete, legumes crus, carnes cruas, peixes e frutos do mar crus e defumados (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; BUENO et al, 2010; ORSI; DEN BAKKER, 2011; BRANDAO et al, 2013; BARANCELLI et al, 2014; SILVA, 2015; SILVA et al, 2017). Casos de listeriose vêm aumentando em todo o mundo devido à mudança do estilo de vida dos consumidores, que estão consumindo alimentos mais crus e frescos (NEWELL et al, 2010; SILVA et al, 2015).

A grande problemática de *L. monocytogenes* é a sua capacidade em crescer em ambiente refrigerado e de formar biofilme em superfícies de ambiente industriais, gerando contaminação do produto pós-processamento. Em produtos considerados prontos para consumo o risco aumenta, pois, estes alimentos são muitas vezes mantidos em condições nas quais a *L. monocytogenes* resiste (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; ORSI; DEN BAKKER, 2011). Outro problema encontrado é o longo período de incubação (três a 90 dias), o que dificulta a identificação das fontes e rotas de transmissão por meio das técnicas convencionais de investigação epidemiológica (WIEDMANN, 2002). Uma das dificuldades enfrentadas pelas indústrias é a persistência de cepas de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento, gerando contaminações recorrentes nos produtos (CRUZ et al, 2008; CARPENTIER; CERF, 2011; BARANCELLI et al, 2014).

A vigilância epidemiológica das DTA no Brasil começou em 1999, sendo implantada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Mapa) e o Instituto Pan-Americano de Alimentos da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). O registro de DTA ocorre através da notificação por formulário do Sistema de Informação dos Agravos de Notificação (Sinan). A Vigilância Epidemiológica em parceria com a Vigilância Sanitária realiza entrevistas com os envolvidos e recolhimentos de amostras dos alimentos suspeitos que são enviados para os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacen), para identificação do patógeno (ROSAS; BRANDÃO; LOPES, 2017). O Sinan divulga periodicamente os dados de surtos de DTA ocorridos no Brasil (Figura 3). As regiões Sul e Sudeste possuem o maior percentual de casos de surtos relatados (24,8 e 43,8%). Na maioria dos surtos (66,8%), os alimentos que atuaram como veículo de contaminação não são identificados, alimentos mistos são responsáveis por 9% dos surtos, seguido de água (6%).É

importante enfatizar que não há nenhum dado relatado sobre a ocorrência de surtos de listeriose no Brasil (Figura 4), o que demonstra como este microrganismo é negligenciado, já que em outros países ocorrem frequentes surtos de listeriose e o patógeno é frequentemente isolados de alimentos no Brasil (BRASIL, 2016).

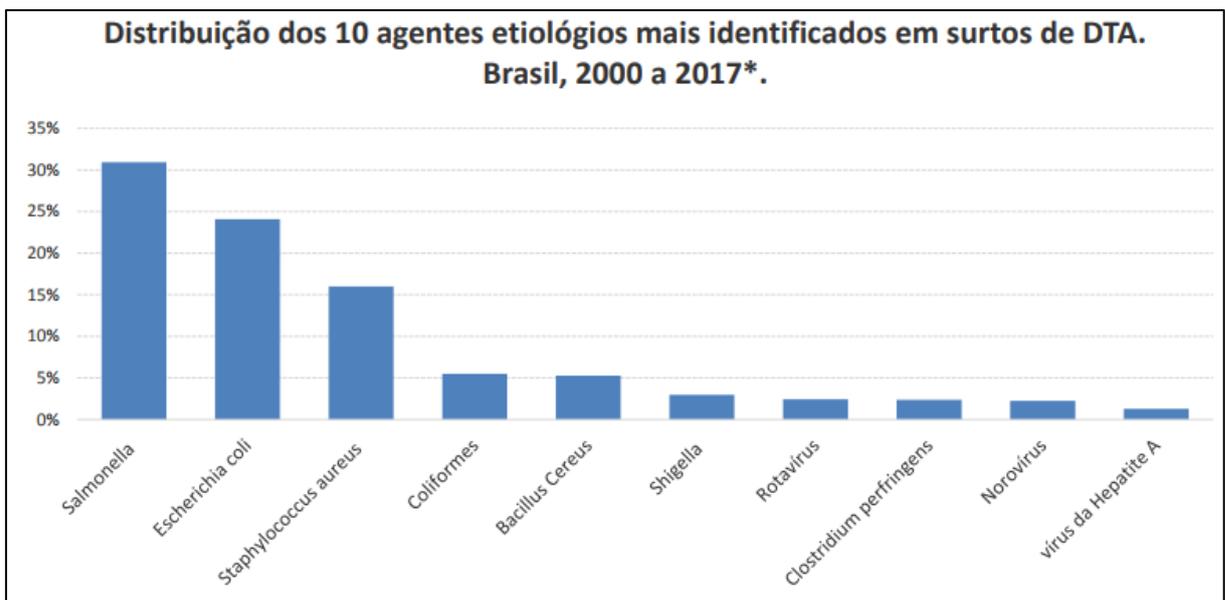
Figura 3 - Dados divulgados sobre o número de surtos ocorridos de DTA entre 2007-2017 por regiões no Brasil



\*Dados sujeitos a atualização

Fonte: (Sinan/SVS/Ministério da Saúde, 2018).

Figura 4 - Microrganismos envolvidos em surtos de DTA no Brasil de 2007 a 2017



\*Dados sujeitos a atualização

Fonte: (Sinan/SVS/Ministério da Saúde, 2018).

### 1.3 Ocorrência de listeriose no mundo

Os primeiros surtos de listeriose foram relatados no início do ano de 1980 (TILNEY; TILNEY, 1993). De acordo com o CDC, até 1997, a estiva anual era de 2.500 casos de listeriose nos Estados Unidos (EUA) com 500 mortes. No relatório publicado no ano de 2011, houve uma queda para 1.591 casos. Nos EUA estima-se que o custo anual de casos agudos de listeriose seja de cerca de 2,3 bilhões de dólares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016). A *European Food Safety Authority* (EFSA) também divulgou um número similar de casos em 2011 na União Europeia, com cerca de 1.470 casos em humanos com uma taxa de mortalidade de 12,7% (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2016).

Diversos estudos ao redor do mundo vêm relatando surtos de listeriose em outros países. Um estudo global publicado em 2014 estimou que foram causadas 23.150 doenças relacionadas a *L. monocytogenes* ao redor do mundo em 2010. O estudo utilizou dados da OMS fornecidos por região que, apesar de ser um número estimado pois muitos países não possuíam dados estatísticos relacionados ao patógeno, mostrou um panorama da ocorrência da listeriose pelo mundo (NOORDHOUT et al, 2014). Além disso, é possível encontrar na literatura científica diversos trabalhos publicados em países distintos que estudaram a epidemiologia de surtos e casos de esporádicos de listeriose ocorridos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; GILMOUR et al, 2010; KNABEL et al, 2012; MAMMINA et al, 2013; ROCHA et al, 2013; CRUZ et al, 2014; HALEY et al 2015; MIYA et al, 2015; YIN et al, 2015; CHEN et al, 2016; ZHANG et al, 2016).

Segundo dados da OMS do ano de 2010, a mediana da taxa de listeriose em diferentes regiões no mundo é bastante similar: 0,01/100.000 pessoas na África, Oriente médio, mediterrâneo e Sul-leste Asiático; 0,2/100.000 pessoas na Europa e no Pacífico Ocidental; e 0,3/100.000 pessoas nas Américas (KIRK et al, 2015). Em alguns países do norte da Europa, a incidência de listeriose foi acima dos demais países nos últimos anos (0,6-1,6/100.000 pessoas), provavelmente devido ao aumento da ingestão de alimentos prontos para consumo (JENSEN et al, 2010; EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2012).

O *Codex Alimentarius* publicou um documento que estabelece diretrizes desde a produção primária de produtos até o monitoramento ambiental de indústrias para que seja prevenida a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes* (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007). Aspectos microbiológicos são abordados no documento visando orientar os governos no estabelecimento de critérios para controle da bactéria em alimentos prontos para

consumo. O documento classifica os alimentos em duas categorias (1) Alimentos prontos para consumo em que o crescimento de *L. monocytogenes* não irá ocorrer e (2) Alimentos prontos para consumo em que o crescimento de *L. monocytogenes* pode ocorrer. Na primeira categoria, o *Codex Alimentarius* estabelece um plano de duas classes onde: num total de cinco amostras, todas devem apresentar contagem inferior a 100 unidades formadoras de colônia (UFC)/g. Já na segunda categoria, quando o alimento pode favorecer o crescimento de *L. monocytogenes*, o *Codex Alimentarius* estabelece um plano de duas classes onde: em cinco amostras todas devem apresentar ausência/25 g (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2007).

Atualmente os EUA possui uma política sanitária de “tolerância zero” para *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo, incluindo alimentos lácteos. Outros países adotaram políticas sanitárias similares para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos, como o Canadá que dividiu os alimentos em categorias de acordo com suas condições de consumo e armazenagem. Já a União Europeia estabeleceu limites de acordo com as características dos alimentos de favorecer o crescimento de *L. monocytogenes* e de acordo com os consumidores do produto (UNIÃO EUROPEIA, 2005; ORSI, DEN BAKKER; WIEDMANN, 2011).

Desde 1996, o CDC conta com o *Foodborne Diseases Active Surveillance Network* (FoodNet), que é uma rede de vigilância ativa das DTA. O *FoodNet* fornece uma base para políticas de segurança alimentar e de prevenção de DTA. Ele estima o número de DTA, monitora as tendências de incidência de doenças específicas transmitidas pelos alimentos ao longo do tempo, atribui doenças a alimentos e cenários específicos, e participa da divulgação dessas informações. No site da rede, é possível encontrar desde 2011 relatórios dos surtos de listeriose que ocorrem nos EUA. A vigilância sanitária americana investiga os casos de listeriose que ocorrem no país, definindo o alimento incriminado, pessoas afetadas, número de mortes e hospitalizações. As investigações de surtos são longas, principalmente porque muitas delas estão relacionadas a produtos industriais e, por isso, envolvem muitos estados americanos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

Em 2011, ocorreu o maior surto de listeriose relatado até o momento no território americano, onde o alimento incriminado foi o melão produzido no Colorado. Um total de 147 pessoas foram infectadas em 28 estados, e a idade mediana de infectados era de 78 anos. Ocorreram 33 mortes e um caso de aborto espontâneo foi associado ao surto. Dentre as doenças relatadas, sete estavam relacionadas com gravidez, sendo que três foram diagnosticadas em recém-nascidos. Em 2014, ocorreu outro importante surto envolvendo maçãs carameladas, onde 35 pessoas de 12 estados americanos foram acometidas, dentre estas pessoas, 11 foram associadas a gravidez (a doença ocorreu em mulher grávida ou foi diagnosticada no recém-

nascido). Foram relatados também três casos de meningite em crianças saudáveis, entre 5-15 anos e o surto ocasionou sete mortes. Em 2015, ocorreu um surto que envolveu nove estados americanos que foi relacionado também com casos de listeriose que ocorreram no Canadá. O surto apresentou um total de 19 pessoas infectadas com uma morte, e o alimento incriminado foi salada embalada produzida em Springfield. Esse surto foi detectado em cinco províncias canadenses pela *Canadian Food Inspection Agency* (CFIA), com um total de 14 infectados, com três mortes, porém não foi determinado a relação das mortes com a doença (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016; PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA, 2016). Em 2016, um surto multiestado teve início nos EUA envolvendo queijo de leite cru macio. Oito indivíduos foram infectados em quatro estados americanos, sendo que dois indivíduos vieram a óbito, e um dos pacientes era um recém-nascido (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Os EUA possuem uma rede bem estruturada para investigações de surtos, o que permite detectar e controlar surtos em todo o território. Através do *PulseNet*, que é uma rede nacional de laboratórios que coleta informações de patógenos isolados de pacientes, onde é utilizada a técnica de eletroforese de campo pulsado em gel (PFGE) e atualmente o sequenciamento total do genoma. A rede permite a comparação dos perfis de banda de DNA, e quando há correspondência entre pacientes é iniciada a investigação do surto. O sistema de epidemiologia nacional de infecções por *Listeria* é responsável pela coleta de dados dos pacientes e por determinar os possíveis alimentos relacionados com o surto. Um outro banco de dados, GenomeTrakr, é responsável pelos isolados de alimentos e por verificar possíveis ligações de casos registrados no *PulseNet*. Esses três sistemas são responsáveis por detectar os surtos presentes no país e evitar que mais indivíduos sejam infectados possibilitando o recolhimento do alimento incriminado. O Brasil, junto com outros 82 países, faz parte do *PulseNet* Internacional, através do *PulseNet* Latino-americana e do Caribe (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2016).

#### **1.4 Ocorrência de listeriose no Brasil**

No Brasil, o cenário é bem diferente em comparação a países desenvolvidos. Até o ano de 2017 não há registro de dados oficiais de surtos de *L. monocytogenes* no Brasil (BRASIL, 2017a). Contudo, dados referentes a casos de infecções esporádicos no Brasil podem ser encontrados na literatura, sendo a maioria referente a pesquisas científicas (SUASSUNA et al, 1969; ESPER et al, 1978; LANDGRAF et al, 1999; HOFER; REIS; HOFER, 2006;

VASCONCELOS et al, 2008; BUENO et al, 2010). Apesar de não haver comprovação da ligação, é provável que a maioria dos casos esporádicos de listeriose seja de origem alimentar, o que tornaria importante a identificação do alimento envolvido (HOFER; REIS; HOFER, 2006). Apesar de qualquer surto de DTA ser considerado um Evento de Saúde Pública que, de acordo com a Portaria nº 204 de 17/02/2016 (BRASIL, 2016), é de notificação compulsória, por se tratar de um microrganismo de difícil cultivo, a identificação de casos de listeriose humana muitas vezes é negligenciada, levando a subnotificação dos dados epidemiológicos de listeriose no país. Por esta razão, muitos estudos demonstram a presença de *L. monocytogenes* em alimentos e no ambiente de processamento de alimentos, mas pouco se sabe sobre a incidência de listeriose humana no Brasil (LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007; BLUM-MENEZES et al, 2013; SILVA, 2015; BRASIL, 2016; SILVA et al, 2017)

O monitoramento do patógeno em alimentos também é precário. A RCD nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), estabelece critério para *L. monocytogenes* apenas em queijos de alta e média umidade (exemplos: queijos tipo minas frescal, muçarela, coalho). Para esta análise é adotado o plano de amostragem de duas classes, onde o alimento é classificado como aceitável ou inaceitável. Para *L. monocytogenes* o critério estabelecido para aceitação é ausência do microrganismo em 25 gramas de amostra (BRASIL, 2001). Esta RDC está atualmente em revisão e a expectativa é que o parâmetro para *L. monocytogenes* seja aplicado a todos os alimentos prontos para consumo (BRASIL, 2017b; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA, 2017).

A presença de *L. monocytogenes* no país foi descrita pela primeira vez por Suassuna e colaboradores (1969), onde o patógeno foi isolado do líquido de um paciente no antigo Estado da Guanabara. Hofer e Menezes (1969) obtiveram dois isolados do patógeno de 42 amostras, desta vez de secreção vaginal de mulheres apresentando histórico de abortos crônicos. Esper e colaboradores (1978) identificaram *L. monocytogenes* em líquido de 12 casos de meningite ocorridos entre 1975 e 1977. Em São Paulo, Landgraf e colaboradores (1999) detectaram o patógeno em cinco bebês que apresentaram quadros de meningite. Um estudo realizado em Porto Alegre, em 2003, identificou *L. monocytogenes* em 50 de 148 amostras oriundas de placentas humanas de abortos e nascimentos pré-maturos (SCHWAB; EDELWEISS, 2003)

O Instituto Oswaldo Cruz (IOC) realizou um grande estudo onde foram analisadas 266 amostras de espécimes clínicos coletados entre 1969 e 2000, em Pernambuco, Bahia, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná e Rio Grande do Sul, todas com diagnóstico presuntivo para *Listeria*. Em 245 (92,10%) amostras foi identificado *L. monocytogenes*, com predominância de isolamento em indivíduos com meningite purulenta. O

estudo evidenciou maior prevalência da listeriose em populações com condições socioeconômicas mais privilegiadas, relacionando este fato ao acesso a um sistema de saúde mais avançado que permitiu o diagnóstico e ao maior consumo de alimentos prontos para consumo (HOFER, REIS & HOFER, 2006).

Alguns estudos epidemiológicos foram desenvolvidos utilizando-se tipagem molecular no Brasil. Cruz e colaboradores (2008) analisaram o ambiente de processamento de uma indústria de salmão, avaliando não só as superfícies que tinham contato direto com o alimento, como também amostras de manipuladores, amostras do peixe antes e pós-processamento e superfícies sem contato com o pescado. Os isolados foram tipados pela técnica de PFGE. As análises dos perfis de restrição indicaram que as cepas foram introduzidas no ambiente industrial, principalmente, via matéria-prima, e também pela contaminação cruzada via manipuladores e outras superfícies. Essa contaminação se expandiu por toda a cadeia produtora, e acarretou a presença de bactérias viáveis no produto já embalado.

Em 2010, um estudo comparativo de amostras de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e de amostras clínicas de casos brasileiros caracterizou as amostras por ribotipagem. As amostras foram agrupadas em quatro grupos filogenéticos distintos que apresentaram forte relação genética entre determinados isolados clínicos e de alimentos, sugerindo que os casos clínicos podem ter sido oriundos do consumo de alimentos contaminados com o patógeno (BUENO et al, 2010).

Sant'Ana e colaboradores (2012) detectaram a presença de *L. monocytogenes* em 3,1% de vegetais prontos para consumo num estudo envolvendo 512 amostras comercializadas em São Paulo. Em 2016, Byrne e colaboradores avaliaram vegetais crus congelados e prontos para consumo, vendidos em supermercados de Salvador, obtendo um percentual de isolamento de 3,03%, em 132 amostras analisadas. Os sorotipos mais isolados de amostras alimentares, segundo Vallim e colaboradores (2015), são os sorotipos 1/2a, 1/2b, e 4b em alimentos cárneos não processados, e 1/2a e 4b em carnes processadas e alimentos prontos para consumo.

Estudos realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), avaliando alimentos prontos para consumo, demonstraram a contaminação por *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas Frescal, hortaliças, saladas, alimentos provenientes da culinária japonesa e produtos cárneos fatiados (BRANDÃO et al, 2013; SILVA, 2015; SILVA et al, 2017).

### 1.5 Métodos moleculares aplicados no estudo da diversidade de *L. Monocytogenes*

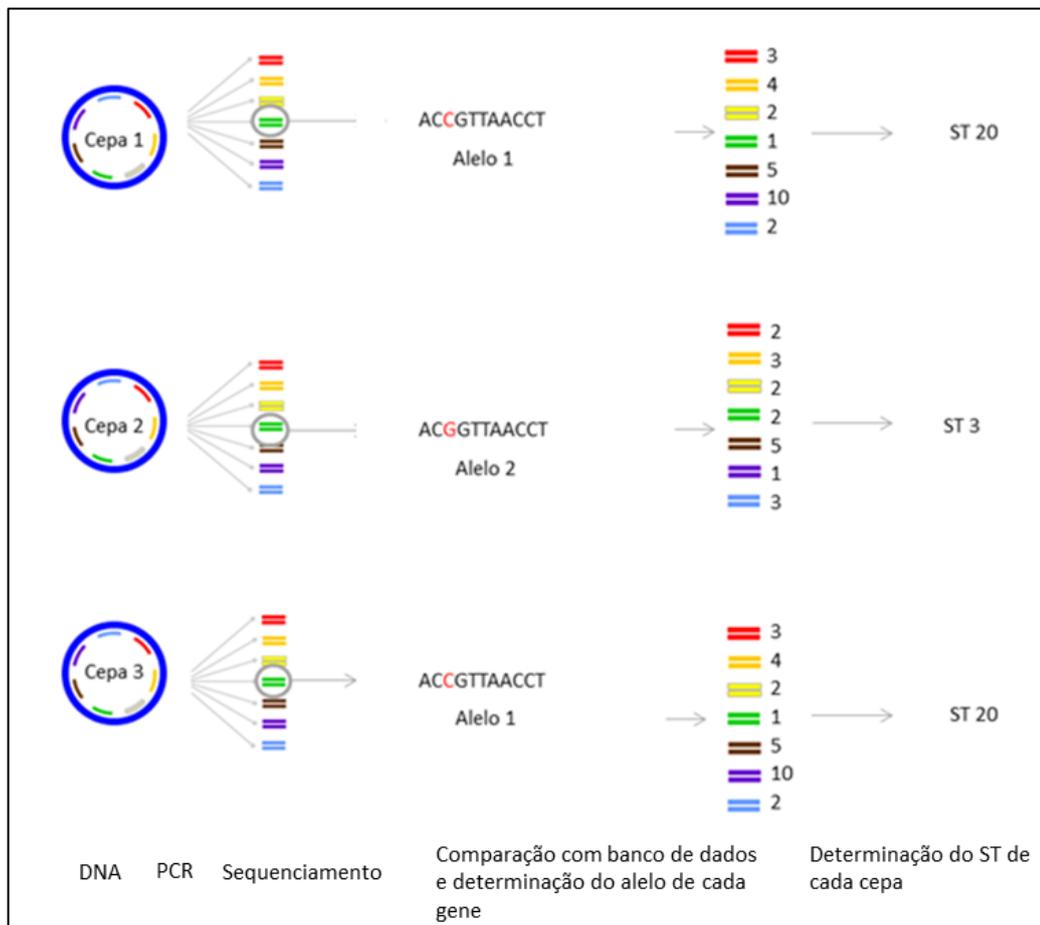
O estudo da diversidade bacteriana se tornou uma ferramenta útil em investigações epidemiológicas. A utilização de biomarcadores tornou possível medir o grau de exposição e de susceptibilidade de uma população a diversos microrganismos. Epidemiologia molecular é a ferramenta de análise de ácidos nucleicos e de expressão de proteínas aplicando os princípios da biologia molecular nos problemas de saúde pública (FORATTINI, 2005).

A diversidade populacional de *L. monocytogenes* pode ser estudada através de diversos métodos. O uso de técnicas de tipificação molecular permite relacionar isolados bacterianos de surtos ou casos esporádicos, com isolados de alimentos e ambiente (JADHAV; BHAVE; PALOMBO, 2012). A técnica de PFGE é ainda a técnica mais indicada pelo CDC, devido a sua repetitividade satisfatória quando realizada em um mesmo laboratório e por apresentar alto nível de discriminação (BROSCH; CHEN; LUCHANSKY, 1994; MAGALHÃES et al, 2005), embora muitas vezes não seja possível diferenciar cepas epidemiologicamente independentes de *L. monocytogenes*. Contudo, devido a complicações de padronização de protocolos entre laboratórios distintos (reprodutibilidade), muitas vezes a comparação de dados interlaboratoriais é difícil (GRAVESEN et al, 2000; WIEDMANN, 2002). Por utilizar enzimas de restrição para gerar um padrão de bandas de DNA, alterações genéticas nos sítios de clivagem das enzimas podem gerar perfis diferentes entre as cepas, e que, nem sempre, estão relacionados com propriedades epidemiológicas. Apesar de sua eficácia na tipificação molecular de cepas bacterianas, a técnica não fornece informações sobre a história evolutiva dos microrganismos (GRAVESEN et al, 2000).

Com o passar dos anos, novas técnicas moleculares foram desenvolvidas, principalmente para suprir as necessidades das pesquisas científicas e epidemiológicas. A técnica de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), foi proposta em 1998, como um método portátil e universal, que permite medir parentesco genético e analisar variações na sequência entre alelos de várias cepas. A técnica faz uso de sete genes constitutivos conservados, chamados de “housekeeping” presentes no DNA bacteriano. Esses genes apresentam uma baixa taxa de evolução por serem responsáveis por codificar importantes enzimas celulares, necessárias para a sobrevivência bacteriana (MAIDEN et al, 1998). Após o sequenciamento desses genes, cada perfil de alelo é denominado *Sequence Type* (ST) (Figura 5), e esses perfis são submetidos a um banco de dados que permite a comparação dessas sequências de nucleotídeos com dados de diferentes regiões do mundo (COOPER & FEIL, 2004; AANENSEN & SPRATT, 2005). A técnica é capaz de classificar os isolados em Complexos

Clonais (CC) que são grupos de isolados que possuem ancestralidade comum e pequenas diferenças ocasionadas por mutações. Para ser classificado como mesmo CC os isolados não podem diferir em um determinado número de alelos. No caso do patógeno *L. monocytogenes*, os CC devem possuir 6 alelos em comum (CHEN et al, 2016).

Figura 5 - Esquema das etapas da técnica de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST)



Fonte: Do autor, 2018

Para tipificação de cepas das espécies *L. monocytogenes* a técnica utiliza sete genes conservados, que são: *abcZ* (*ABC transporter*), *bglA* (*beta glucosidase*), *cat* (*catalase*), *dapE* (*succinyl diaminopimelate desuccinylase*), *dat* (*D-amino acid aminotransferase*), *ldh* (*L-lactate dehydrogenase*) e *lhcA* (*histidine kinase*). O protocolo e o banco de dados se encontram disponíveis no site do *Institut Pauster* na França. Até a presente data, o banco de dados possui 3.335 cepas depositadas, sendo 55 cepas isoladas no Brasil e destas cinco são de origem clínica (último acesso: 17/01/2018) (INSTITUT PAUSTER, 2017).

Henri e colaboradores (2016) estudaram uma população de 1.894 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos no laboratório de referência da França no período de 1999

a 2014. Com uso da técnica de PFGE como uma triagem inicial na tipificação, 396 cepas foram selecionadas e submetidas a técnica do MLST. O estudo dividiu as amostras em 73 grupos, onde os dois mais prevalentes corresponderam ao ST9 e ST121, e a comparação das duas técnicas permitiu concluir que o ST121 incluiu o menor número de estirpes clínicas, o que pode indicar uma baixa virulência, demonstrando a relevância de estudos moleculares para modelos de análise de risco em segurança alimentar.

Utilizando a técnica de MLST combinada a PCR-multiplex para genes de virulência, Wu e colaboradores (2016) analisaram alimentos prontos para consumo de lojas de varejo chinês e constataram a presença de 14 ST diferentes de *L. monocytogenes*, sendo quatro novos. Estudos sobre a presença do gene de virulência responsável pela invasão da célula hospedeira *InlA* revelaram que a maioria das cepas continham o gene completo, e a combinação destes resultados com os obtidos pelo MLST demonstraram a presença de cepas com potenciais de virulência distintos, sugerindo que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos prontos para consumo na China podem ser capazes de causar listeriose em humanos.

O surgimento das tecnologias de sequenciamento de nova geração tem reduzido drasticamente o custo do sequenciamento do DNA de microrganismos, fazendo do sequenciamento do genoma total (WGS) uma ferramenta conveniente para epidemiologia molecular e investigação de surtos de DTA (POPOVICH; SNITKIN, 2017). Com isso, esta tecnologia está se tornando o método de escolha para genotipagem de cepas de *L. monocytogenes* em muitos laboratórios de referência no mundo. Contudo, WGS ainda é proibitivo na rotina de muitos laboratórios e gera uma quantidade massiva de dados que requerem intensa análise com ferramentas de bioinformática, especialmente para se testar um número grande de isolados (DATTA; LAKSANALAMAI; SOLOMOTIS, 2013).

#### 1.5.1 MVLST como alternativa

Uma variação da técnica do MLST foi desenvolvida por Zhang, Jayarao e Knabel (2004), o *Multi-Virulence-Locus Sequence Typing* (MVLST), para tipificação de *L. monocytogenes*. Esta técnica utiliza seis genes que possuem funções relacionadas a patogenicidade e que são mais propensos a alterações pelas variações ambientais e a resposta do sistema imunológico do hospedeiro. Esta técnica possui uma maior capacidade de indicar variações gênicas entre sorotipos. Yin e colaboradores (2015) constaram que o MVLST possui uma maior sensibilidade para categorizar cepas epidêmicas e um melhor poder discriminatório

comparado ao MLST. Outros autores também destacaram que a técnica apresenta alto poder discriminatório, concordância epidemiológica, estabilidade, tipabilidade e reprodutibilidade (CHEN; ZHANG; KNABEL, 2007; LOMONACO et al, 2013). A técnica tem como alvos os três genes de virulência *prfA*, *inlB* e *inlC*, que possuem funções críticas para a sobrevivência intracelular, e os três genes associados à virulência *clpP*, *dal* e *lisR*, que atuam na disseminação do patógeno pelo tecido (ZHANG, JAYRAO & KNABEL, 2004; LIU, 2013).

Após amplificação e sequenciamento, as sequências dos genes são comparadas com sequências depositadas no banco de dados do MVLST, que pode ser acessado através do site <https://sites.google.com/site/mvlstdatabase/home> (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013). O banco compara os perfis dos genes dos isolados a perfis depositados anteriormente no banco e os classifica como alelos. O conjunto dos alelos de cada um dos seis genes é classificado como *Virulence Typing* (VT). Até a presente data, 186 VT estão cadastrados no banco (último acesso: 06/02/2018) (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013).

A proteína codificada pelo gene *prfA* é um importante fator de regulação transcricional de *L. monocytogenes*, que está ausente em *L. innocua*, e é responsável pela ativação da maioria dos genes de virulência conhecidos do patógeno, se ligando a uma sequência palindrômica conhecida como PrfA-box, localizado na região promotora que codifica os genes de virulência (GLASER et al, 2001). O gene *inlB* é responsável por sintetizar o polipeptídeo de mesmo nome associado à parede celular bacteriana. Estudos mostram que o polipeptídeo InlB é essencial para a entrada da *L. monocytogenes* nos hepatócitos, porém existem outros fatores que também estão envolvidos neste processo (DRAMSI et al, 1995). O gene *inlC* é responsável pela síntese do polipeptídeo InlC que também é essencial para a infecção dos hepatócitos, além de atuar na disseminação célula-a-célula e nas interações com as demais células do hospedeiro (LEUNG et al, 2013). O gene *clpP* é responsável pela codificação da proteína ClpP e possui importante papel na sobrevivência intracelular de *L. monocytogenes* sob estresse. Gaillot e colaboradores (2000) sugeriram que a proteína está envolvida na resposta adaptativa da bactéria durante o processo infeccioso intracelular. O gene *dal* sintetiza a enzima alanina-racemase, uma das enzimas responsáveis pela biosíntese da D-alanina, aminoácido necessário para a síntese de componentes mucopéptídicos da parede celular da bactéria (THOMPSON et al, 1998). O último gene utilizado na técnica é o *lisR*, que codifica um regulador de transcrição e atua junto com o gene *lisK* como um sistema regulador de dois componentes essenciais para virulência do patógeno, no retardamento do crescimento da bactéria na presença de nisina (conservante natural de alimentos) e na resistência a cefalosporina, inata ao patógeno (COTTER; GUINANE; HILL, 2002).

Por se tratar de genes relacionados à virulência de *L. monocytogenes*, espera-se que suas taxas de recombinação sejam baixas, já que grandes alterações nessas sequências poderiam gerar estirpes não virulentas (SMITH; FEIL; SMITH, 2000; CHEN; ZHANG; KNABEL, 2005).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos ao longo dos anos comparando a técnica de MVLST às técnicas de tipificação molecular normalmente utilizadas em estudos epidemiológicos. Zhang, Jayarao e Knabel (2004) relataram que a técnica possui maior poder discriminatório em cepas do sorotipo 1/2a quando comparada à técnica de MLST. Chen, Zhang e Knabel (2007) relataram que o MVLST apresentou um melhor poder discriminatório para subtipificação de isolados de *L. monocytogenes* em surtos ocorridos nos EUA. Os autores avaliaram a capacidade da técnica de distinguir clones epidêmicos, analisando 58 isolados relacionados a 14 surtos e 49 isolados não relacionados. Os resultados comprovaram o alto poder discriminatório do MVLST; o valor do Índice de discriminação (SID) encontrado neste estudo foi de 0,99. O MVLST foi capaz de identificar com precisão três clones epidêmicos (I, II e III) e redefiniu o ECIV com o sorotipo 4b de *L. monocytogenes*. A análise filogenética apresentou congruência entre os grupos obtidos pelo MVLST, sorotipos e linhagens genéticas previamente definidas para o patógeno. Devido ao fato da técnica de MVLST utilizar Polimorfismos de Nucleotídeo Simples (SNP) para diferenciação de alelos, o estudo concluiu que SNP parecem ser ótimos marcadores para investigações epidemiológicas em casos de surto e epidemias de *L. Monocytogenes*, tornando a técnica uma valiosa ferramenta para epidemiologia.

Um trabalho realizado na Nova Zelândia, em 2014, utilizando a técnica de MVLST, concluiu que cepas isoladas de frutos do mar possuíam perfis de virulência idênticos a cepas de casos esporádicos de listeriose no país, comprovando o potencial risco para a saúde destas estirpes ambientais (CRUZ et al, 2014). Haley e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade de *L. monocytogenes* de um rebanho leiteiro nos EUA e observaram, através da técnica de MVLST, que bactérias isoladas de fezes do gado leiteiro de uma fazenda possuíam o mesmo perfil de isolados de casos clínicos, alimentos e meio ambiente. Como resultado, algumas cepas obtidas das fezes estavam intimamente relacionadas a clones epidêmicos associados a casos de listeriose humana. Em estudo realizado com isolados clínicos de casos de listeriose ocorridos no Japão, a técnica de MVLST permitiu a identificação de sete perfis de isolados clínicos idênticos às do clone epidêmico I, que já foi responsável por vários surtos graves em diversos países, evidenciando a presença de cepas potencialmente virulentas no país (MIYA et al, 2015).

A técnica de MLST foi utilizada por Martín e colaboradores (2014), para avaliar cepas que foram isoladas de superfícies que entram em contato com alimentos de indústrias de processamento de carne. O perfil mais prevalente identificado foi o ST09, que posteriormente foi submetido ao MVLST para avaliar o perfil de virulência. Foi constatado que a maioria dos isolados do ST09 pertencia ao VT11, o que confirmou uma origem clonal dos isolados nas indústrias. De acordo com os autores, a técnica de MVLST é capaz de diferenciar as cepas de complexos clonais contribuindo para programas de controle *L. monocytogenes* nas indústrias de carne.

Como tentativa de correlacionar a virulência com a evolução de *L. monocytogenes*, Yin e colaboradores (2015) avaliaram 86 cepas de *L. monocytogenes* oriundas de oito países, isoladas durante o período de 1926 a 2012. Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de MLST e MVLST, que apresentaram uma alta correlação entre isolados de quatro complexos clonais com clones epidêmicos, que tiveram maior potencial de causar surtos de listeriose, salientando a importância da vigilância desses complexos clonais na prevenção de listeriose.

Diversos trabalhos já avaliaram o poder discriminatório da técnica de MVLST. Chen e colaboradores (2005) estudaram dez isolados de um surto de listeriose ocorrido em vários estados dos EUA, onde 100 pessoas ficaram doentes e 21 vieram a óbito devido ao consumo de cachorros quentes em 1998 (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 1999), e 11 isolados de outro surto ocorrido em 2002 também em território norte americano onde produtos de peru causaram 53 casos com 11 óbitos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2002). Como resultado foi possível observar que a técnica relacionou os dois casos como uma mesma epidemia, ao contrário do PFGE que não correlacionou os dois surtos.

Trabalhos comparando o poder discriminatório entre as técnicas de MVLST e MLST para tipificação de cepas de *L. monocytogenes* já foram publicados na literatura. Knabel e colaboradores (2012) observam que isolados pertencentes ao complexo clonal (CC) 8 do MLST eram classificados como VT59 na técnica de MVLST. Chen e colaboradores (2007) também concluíram que SNP em genes de virulência aparentam serem excelentes marcadores moleculares para investigações epidemiológicas de surtos e epidemias causados por *L. monocytogenes* e que a identificação e o rastreamento de clones epidêmicos e estirpes de surtos permanecem críticos para investigar e prevenir surtos de listeriose.

Rocha e colaboradores (2013) observaram que apesar de pertencerem ao mesmo EC, isolados de *L. monocytogenes* apresentavam perfis de PFGE diferentes, enfatizando a alta

concordância epidemiológica e poder discriminatório da técnica de MVST em relação a técnica de PFGE.

Embora muitos estudos tenham encontrado correlação entre ST e VT (KNABEL et al, 2012; BERGHOLZ et al, 2015), recentemente, Amato e colaboradores (2017) realizaram um estudo envolvendo isolados do norte da Itália classificados como ST38 na técnica de MLST e obtiveram a divisão destes isolados em dois VT diferentes (VT80 e VT104). O estudo mostrou que os VT possuíam caracterização espaço-temporal diferentes. Os dois VT diferenciavam apenas por uma única mutação sinônima no gene *dal*. Ambos os VT foram encontrados em plantas de processamento de queijo Taleggio, o que levou a conclusão de que o VT104 evoluiu do VT 80, devido ao fato de ambos os VT possuírem correlação com o ST38 que é classificado como CC101. Devido a definição de EC como sendo cepas originadas de uma única célula ancestral e envolvidas em surtos geográficos ou temporariamente não relacionados, ambos os VT foram classificados como ECXI. Esse resultado reforça a importância epidemiológica da técnica e o alto poder discriminatório em relação ao MLST. A técnica foi capaz de relacionar os isolados encontrados no norte da Itália, responsáveis por um grande surto não detectado, com o surto envolvendo “ricotta salata” nos EUA.

## 1.6 Justificativa

A listeriose é uma doença monitorada em países desenvolvidos, devido à alta mortalidade que apresenta. É notória a falta de monitoramento dos casos de listeriose ocorridos no Brasil, o que acarreta na subnotificação e subestimação das ocorrências da doença no país. Entretanto, os relatos de isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos consumidos no mercado interno brasileiro são constantes.

A missão do INCQS é de contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária. Desta forma, com o aumento da incidência de casos relacionados ao sorotipo 1/2a em várias partes do mundo, um estudo epidemiológico das cepas circulantes em alimentos isoladas no país torna-se necessário para correlacionar o potencial patogênico das cepas presentes em alimentos com cepas clínicas e alimentares de outros países. A análise das cepas pela técnica de MVLST contribuíra para o esclarecimento do perfil de virulência e fornece uma ferramenta para estudos epidemiológicos deste patógeno tanto em alimentos quanto em casos clínicos.

Os resultados deste estudo poderão sinalizar para os organismos competentes a necessidade de revisão de parâmetros legislativos em vigência, tanto relacionados ao controle de qualidade de alimentos, quanto em relação às doenças de notificação compulsória.

## **2 OBJETIVO**

Determinar a diversidade genética de cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2a isoladas de alimentos e de origem clínica no Brasil, empregando a metodologia do “Multi-Virulence-Locus Sequence Typing” (MVLST).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas bacterianas

Um total de 53 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a foram utilizadas neste estudo, conforme discriminado na Tabela 1. Seis cepas foram isoladas de alimentos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Saneantes (LMAS) (BRANDÃO et al, 2013; SILVA, 2015) do INCQS/Fiocruz; 47 cepas foram cedidas pelo Coleção de *Listeria monocytogenes* da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) sendo três cepas de origem clínica e 44 cepas isoladas de alimentos.

As cepas clínicas foram isoladas de sangue de pacientes. As alimentares foram isoladas de leite e derivados (33,96%), produtos cárneos (26,41%), pratos prontos (16,98%), hortaliças (9,43%) e produtos industrializados (7,54%). As datas de isolamento compreendem o período de 1978 a 2015.

Todas as cepas foram submetidas à sorotipagem convencional por aglutinação segundo Seeliger e Höhne (1979) e por PCR (DOUMITH et al, 2004) pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC/Fiocruz. Foram mantidas em Caldo Extrato de Levedura Tripton de Soja (TSBYE) (BD, EUA) + 20% de Glicerol (Merk, Alemanha) em freezer -80°C e sua pureza foi verificada através do cultivo em placas de Agar Extrato de Levedura Tripton de Soja (TSAYE) após incubação a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas.

Tabela 1 - Informações das cepas utilizadas neste estudo

Cepa/ano	Origem	Local de isolamento
AL370/00	Queijo de coalho	Alagoas
HU74/11	Sangue	Espírito Santo
AL1808/04	Queijo de coalho	LARA/RS
2386/05	Ricota	NE
2381/05	Ricota	NE
2384/05	Ricota	NE
2383/05	Ricota	NE
2387/05	Ricota	NE
2385/05	Ricota	NE <sup>3</sup>
HU63/78	Sangue	Pernambuco
AL850/98	Blanquet de peru fatiado	Rio de Janeiro
AL874/98	Blanquet de peru fatiado	Rio de Janeiro
INCQS835/15	Alface Crespa MP <sup>2</sup>	Rio de Janeiro
INCQS834/15	Alface Roxa	Rio de Janeiro
INCQS833/15	Alface Americana	Rio de Janeiro
INCQS836/15	Alface Crespa MP	Rio de Janeiro
INCQS837/15	Alface Crespa MP	Rio de Janeiro
INCQS838/15	Queijo Minas Frecal	Rio de Janeiro
AL1811/04	Queijo de coalho	Rio Grande do Sul
AL1809/04	Queijo de coalho	Rio Grande do Sul
AL1812/04	Queijo de coalho	Rio Grande do Sul
AL1796/04	Queijo colonial	Rio Grande do Sul
AL102/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL90/15	Presunto	Rio Grande do Sul
AL94/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL92/15	Presunto	Rio Grande do Sul
AL98/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL95/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL89/15	Presunto	Rio Grande do Sul
AL97/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL96/15	Queijo	Rio Grande do Sul

Continuação da Tabela 1

AL91/15	Presunto	Rio Grande do Sul
AL74/15	Presunto	Rio Grande do Sul
AL93/15	Queijo	Rio Grande do Sul
AL2782/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL2777/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL2735/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL2760/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL2747/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL1938/04	Industrializado	Santa Catarina
AL2745/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL1934/04	Industrializado	Santa Catarina
AL1968/04	Industrializado	Santa Catarina
AL2875/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL1917/04	Industrializado	Santa Catarina
AL2761/06	Pratos prontos	Santa Catarina
AL550/91	Leite	São Paulo
AL544/91	Leite	São Paulo
AL543/91	Leite	São Paulo
AL542/91	Leite	São Paulo
AL554/91	Leite	São Paulo
AL976/02	Strogonoffe de frango	São Paulo
HU88/85	Sangue	São Paulo

---

1-Não Especificado; 2 –Minimamente Processado Fonte: Do autor, 2018

### 3.2 Extração e quantificação de DNA

As cepas foram cultivadas em TSBYE (BD, EUA) a  $35 \pm 2$  °C por 48 horas. Após o crescimento, foi realizada a extração de DNA utilizando-se o kit DNeasy blood & tissue (QIAGEN, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA de cada cepa foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Termo Scientific, EUA), e, quando necessário, diluído para a concentração de  $\sim 50$  ng/ $\mu$ L.

### 3.3 Pesquisa dos genes de virulência

Os DNAs extraídos de cada cepa foram submetidos à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a pesquisa dos genes de virulência: *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* e *prfA*. As reações utilizaram os *primers* descritos na Tabela 2, com um volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL do Master Mix PCR (Thermo Scientific, EUA), 0,125 mM de cada iniciador, 1,0 µL da amostra de DNA extraído (~50 ng) e água livre de nucleases (Bio Basic Inc.) q.s.p.25 µL (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013).

As condições para amplificação foram as descritas no protocolo disponível no banco de dados do MVLST e realizadas igualmente para todos os genes: *hot lid* 105°C, desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, seguido por uma extensão final a 72°C por 7 min (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013).

Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas reações da PCR

Gene	Iniciadores	Sequências (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb <sup>1</sup> )
<i>clpP</i>	ClpP-F	CCAACAGTAATTGAACAAACTAGCC	499
	ClpP-R	GATCTGTATCGCGAGCAATG	
<i>dal</i>	dal-F	GGTTTCTGCGTAGCCATTTT	501
	dal-R	GGAAGGGGTCAATCCATACA	
<i>inlB</i>	inlB-F	CATGGGAGAGTAACCCAACC	500
	inlB-R	GCGGTAACCCCTTTGTCATA	
<i>inlC</i>	inlC-F	CGGGAATGCAATTTTTCTACTA	501
	inlC-R	AACCATCTACATAACTCCCACCA	
<i>lisR</i>	lisR-F	CGGGGTAGAAGTTTGTTCGTC	499
	lisR-R	ACGCATCACATACCCTGTCC	
<i>prfA</i>	prfA-F	AACGGGATAAAACCAAAACCA	501
	prfA-R	TGCGATGCCACTTGAATATC	

<sup>1</sup>Pares de base. Fonte: Do autor, 2018

### 3.4 Purificação e sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos da PCR foram purificados com uso do kit EXOSAP Kit (Thermo Fischer, Califórnia, EUA). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 1,0 µL de EXOSAP e 2,0 µL de fosfatase alcalina por poço. Posteriormente, adicionou-se 10 µL do produto de PCR e a placa foi selada e centrifugada a temperatura ambiente por 30s (Centrifuga Spin placa, Labnet). A placa foi acondicionada em termociclador (Life Technologies) e submetida ao ciclo: *hot lid* 105 °C, 37 °C por 15 min e 80 °C por 15 min (ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Protocol). Em

seguida, a placa embrulhada com papel alumínio para proteção contra a luz e congelada a -20°C.

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit *BigDye® Terminator Direct Sequencing* (Applied Biosystems, EUA). Ao abrigo de luz, foram adicionados 1,5 µL de tampão 5X, 2,0 µL do primer *forward* ou *reverse* do gene e 1,0 µL de *BigDye* a cada poço da placa de 96 poços. Posteriormente 5,5 µL dos produtos de PCR purificados foram transferidos à esta placa. A placa foi selada, centrifugada acondicionada em termociclador e submetida ao ciclo: *hot lid* 105°C, 40 ciclos a 94 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60°C por 4 min (adaptado de APPLICATION NOTE Applied Biosystems 9800 Fast PCR System).

Após a reação, os produtos foram submetidos à etapa de precipitação. Foram adicionados 30 µL de isopropanol (Merk, Alemanha) 75% em cada poço. A placa foi selada e mantida em repouso por 15 min. Após, esta foi centrifugada por 45 min a 4.000 rpm em centrífuga (Boeco Germany, modelo U-32R). O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa e foram adicionados 50 µL de etanol (Merk, Alemanha) 75%, e a placa foi novamente selada e centrifugada por 15 min a 4.000 rpm, o sobrenadante foi novamente desprezado. A placa foi centrifugada em posição invertida para eliminação total do sobrenadante, até a centrífuga alcançar 500 rpm. A placa foi submetida a secagem em temperatura ambiente, por 1 ou 2 h, sob o abrigo de luz. Após a secagem a placa foi selada e congelada a -20°C.

A etapa de sequenciamento por eletroforese capilar foi realizada através da Plataforma PDTIS de Sequenciamento/IOC, utilizando o Analisador Automático de DNA ABI 3730 (Applied Biosystems, EUA), de acordo com o protocolo de Otto e colaboradores (2008).

### 3.5 Análise de dados

Os alinhamentos das sequências foram realizados utilizando-se o software Bioedit (Hall, 1999). As sequências de cada gene foram alinhadas com sequências de referência fornecidas pelo banco de dados MVLST (<https://sites.google.com/site/MVLSTdatabase/>) e então os fragmentos foram concatenados de acordo com a sequência de referência. Os cromatogramas obtidos no sequenciamento de ambos os sentidos (*forward* e *reverse*) foram avaliados quanto a qualidade das bases para eliminar possíveis erros do sequenciamento. Em alguns casos, novas reações de sequenciamento foram realizadas para confirmação de determinadas bases.

Após os ajustes necessários, as sequências dos seis genes foram concatenadas utilizando-se o programa online *Fasta alignment joiner* disponível em [http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment\\_joiner.php](http://users-birc.au.dk/biopv/php/fabox/alignment_joiner.php). As sequências concatenadas foram

comparadas entre si, através da construção de uma árvore filogenética *Neighbor-Joining* (NJ) com 1.000 *bootstrap*, utilizando-se o programa MEGA 5.1 (TAMURA et al, 2013), para que as sequências idênticas fossem agrupadas. Um representante de cada grupo foi escolhido para identificação no banco de dados.

Cada gene foi analisado separadamente e comparado com as sequências fornecidas pelo banco de dados, e foram atribuídos os números de cada alelo existente no banco compatível com os encontrados neste estudo. Com isso, foi obtido o perfil alélico de cada cepa que foi comparado com o perfil alélico das cepas descritas no banco de dados para atribuição dos VT.

Em adição, foi realizada a análise dos VT identificados neste estudo por local de origem através da *Minimum spanning tree* (MST) com uso do programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica), tanto das cepas obtidas neste estudo, como de todas as cepas depositadas no banco de dados até a presente data.

A análise comparativa das proteínas codificadas por cada gene foi realizada no programa Bioedit, onde as sequências das cepas obtidas no presente estudo e das cepas disponíveis no banco de dados até a presente data foram traduzidas e comparadas para a detecção de possíveis alterações. Estas sequências de aminoácidos foram concatenadas com uso do programa online *Fasta alignment joiner* para comparação das proteínas das cepas deste estudo com as proteínas dos clones epidêmicos fornecidos pelo banco.

A análise de sítios de polimorfismo foi feita através dos programas DNASP versão 6.10.01 (ROZAS et al, 2017) e do software Arlequin versão 3.11 (Laurent Excoffier, CMPG, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern).

O índice de diversidade de Simpson (SID) foi calculado conforme a fórmula descrita por Hunter e Gaston (1988):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

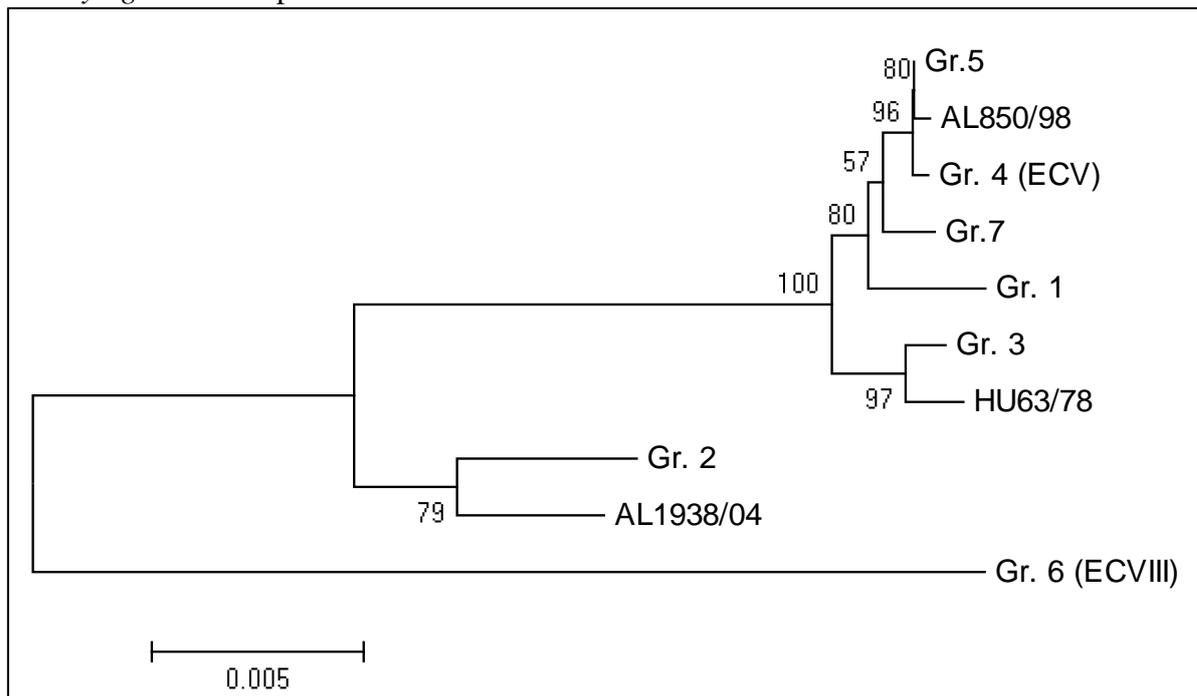
Onde  $N$  é o número total de isolados na população,  $S$  é o número total de genótipos encontrados (VT), e  $nj$  é o número de isolados que pertencem ao tipo  $j$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de MVLST já foi previamente avaliada e apresentou concordância epidemiológica e poder discriminatório similar e até superior a outras técnicas como o PFGE e MLST (ZHANG et al, 2004; CHEN; ZHANG; KNABEL, 2007; LOMONACO et al, 2008; ROCHA et al, 2013). Neste estudo, o MVLST foi utilizado para subtipificar cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2a de diferentes origens e avaliar suas relações filogenéticas.

Com a finalidade de agrupar as cepas e obter um menor número de sequências para as demais análises, uma árvore filogenética com as sequências dos seis genes de virulência concatenados (2.606pb) das 53 cepas de *L. monocytogenes* foi construída por *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1.000 repetições e está apresentada na Figura 6.

Figura 6 - Árvore filogenética *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1000 repetições utilizando as sequências dos seis genes do MVLST concatenados (2.606 pb) das 53 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a



EC: Clone Epidêmico

Gr. 1 - AL2735/06 - AL2875/06;

Gr. 2 - AL370/00 - AL2761/06;

Gr. 3 - AL544/91 - AL543/91 - AL1812/04;

Gr. 4 - HU74/11 - AL1808/04 - AL1809/04 - AL1811/04 - AL1812/04 - AL1917/04 - AL1968/04 - AL2747/06 - AL2760/06 - AL2777/06 - INCQS836/15;

Gr. 5 - AL874/98 - AL976/02 - AL1796/04 - AL1934/04 - 2381/05 - 2383/05 - 2384/05 - 2385/05 - 2386/05 - 2387/05 - AL2745/06 - AL2782/06 - AL74/15 - AL89/15 - AL90/15 - AL91/15 - AL92/15 - AL93/15 - AL94/15 - AL95/15 - AL96/15 - AL97/15 - AL98/15 - AL102/15 - INCQS834/15 - INCQS837/15 - INCQS838/15;

Gr. 6 - INCQS835/15 - INCQS833/15;

Gr. 7 - AL550/91 - AL554/91 - HU88/85

Fonte: Do autor, 2018

As cepas foram divididas em 10 grupos (Tabela 3), ou seja, 10 VT diferentes, apresentando uma relação de 5,3 cepas/VT.

Tabela 3 - Classificação das cepas por VT

VT	n (%)	Cepas
VT11	5,66	AL550/91 AL554/91 HU88/85
VT14	3,77	INCQS833/15 INCQS835/15
VT45	50,94	AL2782/06 2385/05 2386/05 2381/05 2384/05 2383/05 2387/05 AL2745/06 AL1934/04 AL976/02 AL874/98 AL1796/04 AL102/15 AL90/15 AL94/15 AL92/15 AL98/15 AL95/15 AL89/15 AL97/15 AL96/15 AL91/15 AL74/15 AL93/15 INCQS834/15 INCQS837/15 INCQS838/15
VT59	20,75	AL2777/06 AL1811/04 AL2760/06 AL1809/04 AL2747/06 AL1808/04 AL1968/04 AL1917/04 AL18912/04 INCQS836/15 HU74/11
VT68	5,66	AL542/91 AL543/91 AL544/91
VT94	3,77	AL370/00 AL2761/06
VT107	3,77	AL2735/06 AL2875/06
VT184	1,88	AL1938/04
VT185	1,88	AL850/98
VT186	1,88	HU63/18

Fonte: Do autor, 2018

Através do sequenciamento dos seis genes de virulência foi possível identificar 49 das cepas pertencentes a sete VT já depositados no banco de dados. A cepa AL1938/04 apresentou um novo padrão de combinação de alelos, sendo classificado como novo VT 184. As cepas AL850/98 e HU63/18 apresentaram sequências de um alelo diferente das descritas no banco. O isolado AL850/98 apresentou uma nova sequência para o gene *inlB* (novo alelo 43) (Nº acesso GenBank MG594497), enquanto a cepa HU63/18 apresentou uma nova sequência para o gene *prfA* (novo alelo 33) (Nº acesso GenBank MG594498), gerando os novos VT185 e VT186, respectivamente. Na Tabela 4 estão discriminados todos os alelos encontrados para cada gene, assim como o VT correspondente.

Tabela 4 - Caracterização das 53 cepas de *L. monocytogenes* obtidos pela técnica do MVLST.

Cepa	Perfil alélico						VT <sup>1</sup>	EC <sup>2</sup>
	<i>clpP</i>	<i>dal</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>lisR</i>	<i>prfA</i>		
AL550/91	1	6	8	9	1	1	11	-
AL554/91	1	6	8	9	1	1	11	-
HU88/85	1	6	8	9	1	1	11	-
INCQS835/15	4	5	9	10	3	2	14	ECVIII
INCQS833/15	4	5	9	10	3	2	14	ECVIII
AL2782/06	1	17	5	2	1	1	45	-
2385/05	1	17	5	2	1	1	45	-
2386/05	1	17	5	2	1	1	45	-
2381/05	1	17	5	2	1	1	45	-
2384/05	1	17	5	2	1	1	45	-
2383/05	1	17	5	2	1	1	45	-
2387/05	1	17	5	2	1	1	45	-
AL2745/06	1	17	5	2	1	1	45	-
AL1934/04	1	17	5	2	1	1	45	-
AL976/02	1	17	5	2	1	1	45	-
AL874/98	1	17	5	2	1	1	45	-
AL1796/04	1	17	5	2	1	1	45	-
AL102/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL90/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL94/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL92/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL98/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL95/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL89/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL97/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL96/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL91/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL74/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL93/15	1	17	5	2	1	1	45	-
INCQS834/15	1	17	5	2	1	1	45	-
INCQS837/15	1	17	5	2	1	1	45	-
INCQS838/15	1	17	5	2	1	1	45	-
AL2777/06	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL1811/04	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL2760/06	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL1809/04	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL2747/06	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL1808/04	24	17	5	2	1	1	59	ECV
AL1968/04	24	17	5	2	1	1	59	ECV

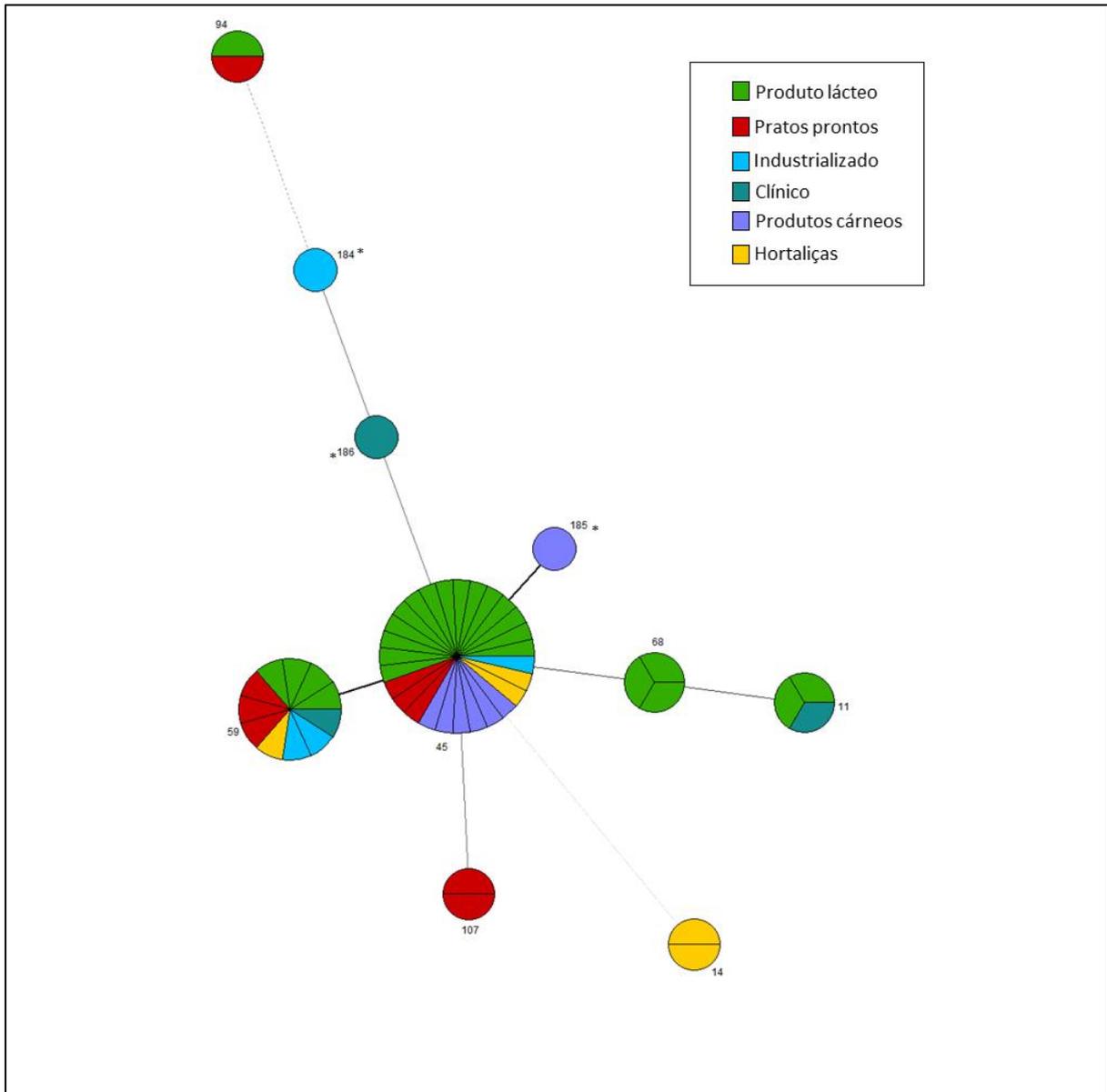
Continuação da Tabela 4

<b>AL1917/04</b>	24	17	5	2	1	1	59	ECV
<b>AL1812/04</b>	24	17	5	2	1	1	59	ECV
<b>INCQS836/15</b>	24	17	5	2	1	1	59	ECV
<b>HU74/11</b>	24	17	5	2	1	1	59	ECV
<b>AL544/91</b>	1	2	5	9	1	1	68	-
<b>AL543/91</b>	1	2	5	9	1	1	68	-
<b>AL542/91</b>	1	2	5	9	1	1	68	-
<b>AL370/00</b>	1	29	20	1	12	13	94	-
<b>AL2761/06</b>	1	29	20	1	12	13	94	-
<b>AL2735/06</b>	1	1	32	24	1	1	107	-
<b>AL2875/06</b>	1	1	32	24	1	1	107	-
<b>AL1938/04</b>	1	33	2	1	1	12	184*	-
<b>AL850/98</b>	1	17	43*	2	1	1	185*	-
<b>HU63/78</b>	1	14	2	2	1	33*	186*	-

<sup>1</sup>- *Virulence type*; <sup>2</sup>-Clone epidêmico; \*Novo alelo ou VT descrito no banco de dados. Fonte: Do autor, 2018

Na Figura 7 está representada a análise do Bionumerics dos VT encontrados com a origem de isolamento.

Figura 7 - *Minimum spanning tree* dos VT das 53 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas neste estudo



A árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* e *prfA*. Círculos indicam o VT específico e o número de cepas de acordo com o tamanho do círculo. As cores dos círculos indicam a origem do isolamento da cepa. Novos VT estão marcados com (\*). Linhas que ligam os VT, indicam que eles diferem em um alelo (linha grossa sólida), ou 3 a 5 alelos (linhas finas e pontilhadas). Fonte: Do autor, 2018

Representantes do VT45 foram os mais encontrados, 27 (50,9 %) cepas no total, que foram isoladas dos mais variados tipos de amostras: pratos prontos (n=2), ricota (n=6), produtos industrializados (n=1), strogonofe de frango (n=1), blanquet de peru fatiado (n=1), queijo colonial (n=1), presunto (n=5), queijo (n=8), alface roxa (n=1), alface crespa minimamente processada (n=1) e queijo Minas Frescal (n=1). Esse VT já foi relacionado com amostras de

locais de processamento de alimentos, alimentos e amostras clínicas. Chen e colaboradores (2007) avaliaram cepas de *L. monocytogenes* isolados de surtos ou não, e identificaram duas cepas pertencentes ao VT45, que não tiveram prévia relação com os surtos estudados, sendo uma amostra de peito de peru e outra oriunda de ambiente de uma indústria alimentícia. Knabel e colaboradores (2012) isolaram uma cepa de hemocultura pertencente ao VT45. Cruz e colaboradores (2014) identificaram uma cepa pertencente ao VT45 em frutos do mar oriundos do Japão. A avaliação dos resultados obtidos neste estudo e dados disponíveis no banco de dados, demonstram não só uma diversidade de locais de isolamento do VT45, como também o potencial patogênico do mesmo, uma vez que este foi isolado a partir de uma amostra de hemocultura.

Três (5,7 %) cepas foram identificadas como VT11, sendo uma isolada de hemocultura (HU88/85) e duas de amostras de leite (HU88/85 e AL554/91). Esse VT já foi identificado em diversas matrizes, como fluido espinhal infantil (ZHANG et al, 2004), alimentos na Espanha e Canadá (KNABEL et al, 2012; MARTIN et al, 2014) e maquinário de indústria alimentícia (MARTIN et al, 2014). Três (5,7 %) cepas foram identificadas como VT68, sendo as três isoladas de amostras de leite (Tabela 1). Este VT já foi identificado por Lomonaco e colaboradores (2013) em um surto ocorrido no EUA em 2011, sendo as cepas provenientes do Departamento de Agricultura dos EUA. A identificação de cepas VT11 e VT68 em amostras de leite observada neste estudo é preocupante, uma vez que este VT está associado a casos de listeriose em humanos e o leite é um alimento amplamente consumido por indivíduos pertencentes ao grupo de risco (grávidas, idosos e imunossuprimidos).

Duas (3,8 %) cepas foram identificadas como VT94. Este VT já foi isolado na Itália em 2012 em amostra de queijo (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013). Este dado é similar ao presente estudo, uma vez que a cepa AL370/00 identificada como VT94 foi isolada a partir de uma amostra de queijo de coalho (Tabela 1).

Duas (3,8 %) cepas foram identificadas como VT107, ambas isoladas de pratos prontos (Tabela 1). Este VT já identificado em amostras ambientais de uma fábrica de cogumelos nos EUA em 2013 (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013).

Duas (3,8 %) cepas foram identificadas como VT14, uma isolada de alface crespa minimamente processada (INCQS835/15) e outro de alface americana (INCQS833/15). Em 1994, um surto de *L. monocytogenes* envolvendo leite com chocolate foi reportado no estado de Illinois nos EUA (SCHWARTZ et al, 1989). Muitos anos depois, Chen e colaboradores (2007) tipificaram a cepa responsável pelo surto pela técnica do MVLST e identificaram que a mesma pertencia ao VT14. Outro surto ocorreu na Pensilvânia em 1987 devido ao consumo de

leite contaminado que também foi relacionado ao VT14 (DALTON et al, 1997). Devido a estes dados epidemiológicos, Bergholz e colaboradores (2015) classificaram este VT como o clone epidêmico VIII (ECVIII). Logo, a identificação do ECVIII em amostras de alface minimamente processadas observada neste estudo é preocupante, pois estes alimentos não sofrem mais nenhum tipo de tratamento que pudesse eliminar o patógeno antes do seu consumo. Além deste envolvimento com surtos, o VT14 já foi detectado em amostras clínicas (ZHANG et al, 2004), alimentos (BERGHOLZ et al, 2016) e ambiente alimentar (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013).

O VT 59, que é classificado como clone epidêmico V (EC V), foi identificado em 11 (20,7 %) cepas, sendo estas isoladas a partir de: alimentos prontos para consumo (n=3), queijo coalho (n=4), produtos industrializados (n=2), alface crespa (n=1) e sangue humano (n=1) (Tabela 1). Este VT foi relacionado a casos esporádicos e surtos de listeriose ocorrido entre 1988 e 2010 no Canadá, comprovando que este clone epidêmico vem causando surtos a mais de duas décadas no país (KNABEL et al, 2012). O VT59 foi identificado em todo o território canadense, sendo responsável por casos graves de listeriose invasiva. O VT59 já foi isolado de outras fontes como carnes, frutos do mar e queijo, sendo a maioria das cepas pertencentes ao sorotipo 1/2a. O EC V também foi isolado de casos de listeriose invasiva entre os anos de 2006-2010 na Itália (MAMMINA et al, 2013). Em 2012, Lomonaco e colaboradores (2011) encontraram isolados deste EC em um grande número de amostras de queijo gorgonzola (MARTIN et al, 2014). Verghese e colaboradores (2011) sugeriram que as cepas pertencentes ao VT59 possuem uma grande capacidade de formação de biofilmes, o que aumenta sua capacidade de contaminar ambientes de indústrias levando a contaminação de produtos alimentícios. A contaminação de diferentes classes de alimentos pelo VT59 identificada neste estudo é preocupante pelo potencial patogênico que estas cepas possuem conforme relatado na literatura.

Ao realizar a análise de *Minimum Spanning Tree* apenas com as cepas desse estudo, podemos confirmar o VT59 é uma variante de único *locus* (SLV) do VT45, sendo sua diferença ocasionada por um único SNP (polimorfismo de nucleotídeo simples) no gene *clpP*. Os VT45 e VT59 foram os mais prevalentes neste estudo, e juntos foram identificados em todas as categorias de alimentos e em uma amostra clínica. O VT185, que foi descrito neste trabalho, também é um SLV do VT45 por apresentar um único SNP no alelo gene *inlB*. O VT68 é um variante de *locus* duplo (DLV) do VT45, sendo estas variações nos genes *dal* (10 SNP) e *inlC* (2 SNP). O VT11 é um variante de *locus* triplo (TLV) do VT45 e um DLV do VT68 devido a diferenças nos genes *dal* (12 SNPs) e *inlB* (1 SNP). O VT186 é um DLV do VT45, sendo as

diferenças nos genes *dal* (9 SNPs) e *prfA* (2 SNPs). O VT184, também descrito neste estudo, é um DLV do VT186, devido a diferenças nos genes *dal* (40 SNPs) e *prfA* (1 SNP). O VT107 é um TLV do VT45, sendo divergente nos genes *dal* (3 SNPs), *inlB* (4 SNPs) e *inlC* (3 SNPs). O VT94 possui apenas dois alelos em comum com o VT184, possuindo diferenças nos genes *dal* (11 SNPs), *inlB* (6 SNPs), *lisR* (1 SNP) e *prfA* (1 SNP). O VT14 não compartilha nenhum alelo com nenhum dos VT identificados neste estudo.

Dois novos alelos foram identificados a partir de sequências de duas cepas. O alelo 43 para o gene *inlB* foi encontrado na amostra AL850/98 (blanquet de peru fatiado) (Tabela 4). Esse alelo possui 1 SNP que o difere do alelo 5 do gene *inlB* do VT45. O segundo alelo identificado foi o alelo 33 do gene *prfA* da amostra HU63/78 que também difere de 1 SNP do alelo 12 do gene *prfA* do VT56 (Tabela 4). Um novo VT foi descrito neste estudo, o VT184, que possui uma sequência de alelos diferentes das descritas anteriormente no banco de dados e possui 3 SNPs comparado com o VT126. Estes achados podem estar relacionados ao fato do banco de dados possuir um número relativamente pequeno de cepas quando comparado ao do MLST, que possui 3.335 cepas depositadas. Além disso, o banco de dados do MVLST não possui nenhuma cepa isolada do Brasil e poucos depósitos oriundos da América do Sul. Outra questão é que as cepas de *L. monocytogenes* estudadas são pertencentes ao sorotipo 1/2a, que pertencem a linhagem II e já foi relatado que a linhagem II é mais afetada pela pressão seletiva e possui uma maior taxa de recombinação quando comparada a linhagem I (DEN BAKKER et al, 2008; CANTINELLI et al, 2013).

A análise de sítios de polimorfismo está apresentada na Tabela 5. A maior diversidade de alelos foi observada nos genes *dal* (8 alelos distintos) e *inlB* (7 alelos distintos) e, consequentemente, foram os que apresentaram os maiores percentuais de sítios polimórficos (Tabela 5). Dos 31 alelos identificados, foi observado um percentual de sítios polimórficos de 5,21% (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de sítios de polimorfismo das sequências dos alelos obtidos no sequenciamento dos seis genes de virulência *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* e *prfA*.

<b>Gene</b>	<b>Tamanho (pb<sup>1</sup>) dos fragmentos</b>	<b>Nº de alelos</b>	<b>Nº de sítios de polimorfismos</b>	<b>% de sítios de polimorfismo</b>
<i>clpP</i>	416	3	13	3,12
<i>Dal</i>	438	8	61	13,92
<i>inlB</i>	433	7	28	6,46
<i>inlC</i>	415	5	15	3,61
<i>lisR</i>	444	3	4	0,90
<i>prfA</i>	460	5	15	3,26
<b>Total</b>	<b>2.606</b>	<b>31</b>	<b>136</b>	<b>5,21</b>

<sup>1</sup>-Pares de base. Fonte: Do autor, 2018

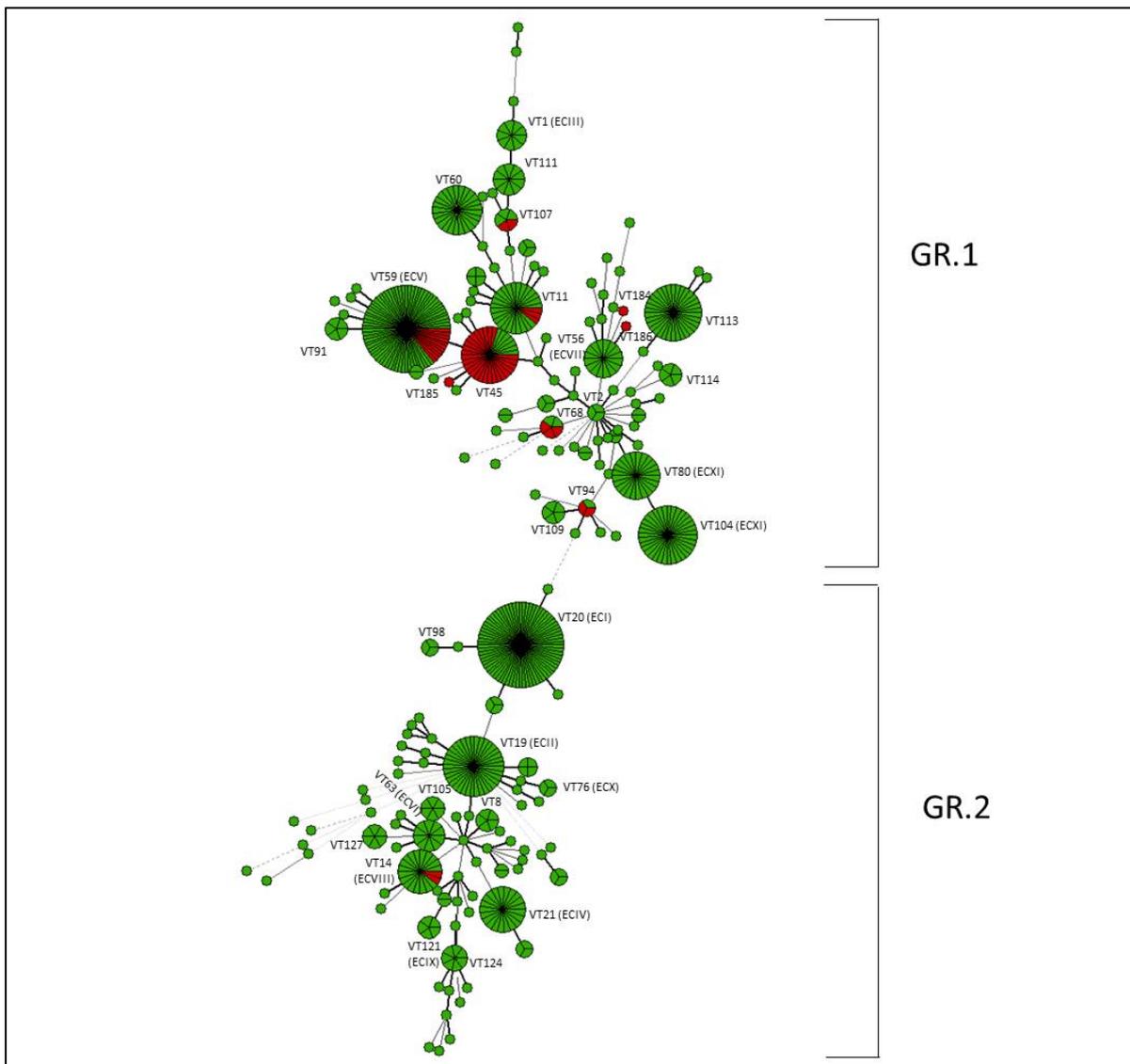
Zhang e colaboradores (2004) ao analisarem vários sorotipos de *L. monocytogenes* obtiveram maiores valores de porcentagem de sítios de polimorfismos, com um total de 11,13. Isso pode estar relacionado ao fato de Zhang e colaboradores (2004) terem avaliado isolados de *L. monocytogenes* dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3b, 3c, 4a, 4b e 4c, enquanto que no presente estudo apenas cepas do sorotipo 1/2a foram avaliadas. Chen e colaboradores (2007) relataram um valor de 12% de sítios polimorfismos em relação ao total de isolados estudados, porém ao observar apenas isolados de uma mesma linhagem, o número de sítios de polimorfismo reduziu bastante (2,86%). Haley e colaboradores (2015) obtiveram resultados semelhantes a este estudo no número de polimorfismos dos genes.

A Figura 8 apresenta a análise por *Minimum Spanning* dos VT encontrados neste estudo em relação a todos os VT depositados no banco de dados até a presente data. Atualmente, o banco é dividido em dois grupos: o primeiro na parte superior da figura (Gr.1), de estrutura polifilética, possui como VT central o VT02 e agrupa quatro dos 11 EC descritos até o momento (III, V, VII e XI). Nesse primeiro grupo estão reunidos a maioria das cepas analisadas no presente estudo. O segundo grupo localizado na parte inferior da figura (Gr.2), mostra a expansão dos VT a partir do VT02 para uma linha inicialmente monofilética, onde o VT 94 contribui com a formação de um sub-grupo composto por 3 VT incluindo o VT 109 com um maior número de cepas. Após uma grande diferenciação de até 5 alelos, este sub-grupo se liga de forma linear com o Gr.2 que inclui os outros sete EC (I, II, IV, VI, VIII, IX e X). Nesse grupo, estão incluídas apenas duas cepas de hortaliças de alimentos. A escassez de dados do banco quanto à origem das cepas não nos permite determinar se há associações de EC com fontes de isolamento, no entanto o maior número de VT associados a EC no Gr.2 e sua estrutura majoritariamente monofilética, sugerem se tratar de um grupo mais envolvido em eventos clínicos e, portanto, mais clonal que o Gr.1 onde a maior diversidade genética é característica

de maior circulação ambiental do que clínica. Dessa forma, podemos sugerir que as cepas de hortaliças encontrados no Gr.2 poderiam estar associados, em eventos anteriores, a infecções em humanos.

Podemos observar que o número de cepas pertencentes ao VT45 aumentou significativamente devido ao depósito das 27 cepas oriundas deste trabalho. O VT 59 foi o segundo mais depositado, sendo identificado em 11 cepas, e apresenta um número expressivo de cepas já depositadas no banco. A maioria dos VT identificados no presente estudo apresentou alguma relação clonal com o VT45, sendo estas SLV, DLV ou TLV deste VT e se apresentaram na parte superior da Figura 6. O VT14, que foi identificado nas amostras de hortaliças INCQS835/15 e INCQS833/15 (Tabela 1), não apresentou relação clonal com nenhum dos outros VT identificados no presente estudo, mas apresentou relação com outros VT já previamente identificados e depositados no banco, no entanto nenhuma das amostras já descritas no banco de dados relacionadas a este VT foram isoladas de hortaliças (Figura 8).

Figura 8 - *Minimum spanning tree* dos VT pertencentes ao bando de dados e das 53 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas neste estudo.



A árvore foi baseada na análise do perfil alélico dos genes *clpP*, *dal*, *inlB*, *inlC*, *lisR* e *prfA*. Círculos indicam o VT específico e o número de cepas de acordo com o tamanho do círculo. As cores dos círculos indicam a origem da cepa, sendo a cor verde de cepas já depositadas no banco de dados e a cor vermelha das cepas avaliadas no presente estudo. Linhas que ligam os VT, indicam que eles diferem em um alelo (linha grossa sólida), ou 3 a 5 locus (linhas finas e pontilhadas). Fonte: Do autor, 2018

Clones epidêmicos são classificados como isolados geneticamente relacionados envolvidos em surtos temporários e geograficamente não relacionados, sendo provavelmente originados do mesmo ancestral (CHEN; KNABEL, 2008, CHEN; ZHANG & KNABEL, 2007, KATHARIOU, 2002). A hipótese sustentada pelos clones epidêmicos é que eles são bem adaptados para o crescimento e/ou sobrevivência em alimentos e ambientes industriais e também possuem altos níveis de patogenicidade (CHEN; KNABEL, 2008). Sendo assim, a detecção dois EC (EC V e EC VIII) em 12 cepas que foram isoladas de alimentos aqui no Brasil

fortalece a hipótese de que os alimentos podem ser veículos de casos esporádicos e surtos não detectados em nosso território. A identificação do EC V em uma amostra de sangue (cepa HU74/11), demonstra a ocorrência de casos de infecções no Brasil relacionadas a este clone.

O SID descreve a capacidade de um método de gerar unidades distintas de isolados não relacionados, ou seja, a probabilidade de suas cepas não relacionadas sejam classificadas em grupos diferentes (STRUELENS, 1996). Este índice é utilizado para mensurar a diversidade genética entre isolados (HUNTER & GASTON, 1988). No presente estudo, o SID obtido neste foi de 0,70, o que corresponde a diversidade completa da coleção de isolados. O SID de produtos lácteos, que foi a matriz que contribui com mais isolados, foi de 0,77. Chen e colaboradores (2007), ao avaliarem 63 isolados de diferentes sorotipos, obtiveram um índice de diversidade alto ( $D = 0,99$ ), ao analisar apenas a população de amostras de sorotipo 1/2a o índice de diversidade é de  $D = 0,87$  ( $n=10$ ). Martin e colaboradores (2014) obtiveram um valor de  $D = 0,84$  ao avaliarem 106 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de indústrias de carne, o SID das amostras pertencentes ao sorotipo 1/2a foi  $D=0,77$  ( $n=20$ ). Miya e colaboradores (2015) obtiveram um índice de diversidade de 0,93 analisando 158 isolados de *L. monocytogenes* de diversas linhagens.

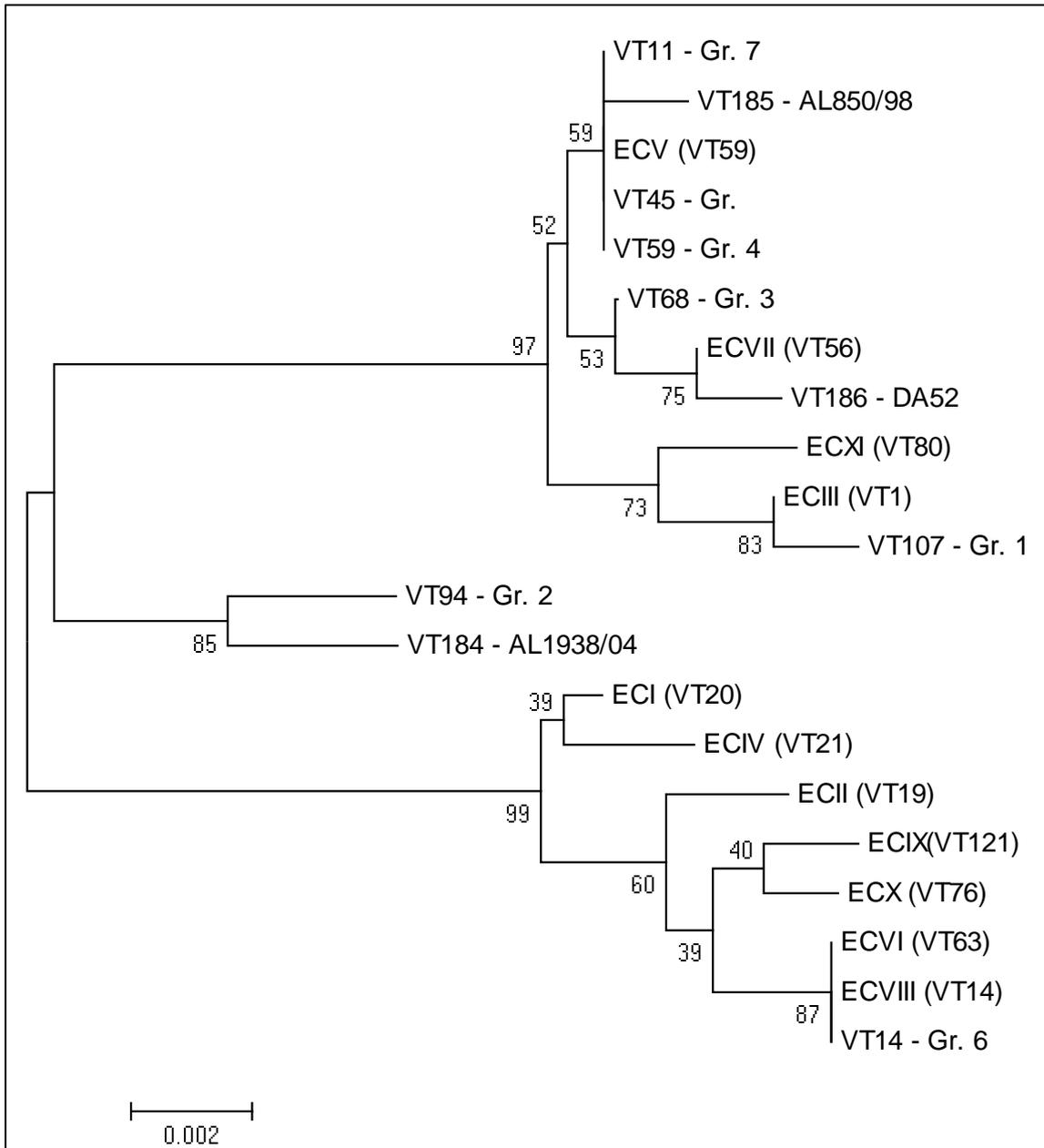
A análise de proteínas foi realizada comparando-se os VT obtidos no presente estudo com os EC descritos no banco de dados. Apesar dos genes serem sequências de codificação parcial de proteínas, esta análise pode fornecer informações importantes relativas aos produtos de cada gene. Foi observado que os genes *clpP* e *lisR* não sofreram alterações de aminoácidos, pois todos os SNPs foram silenciosos. Nos demais genes, foram observadas alterações de aminoácidos ocorridas nos VT identificados neste estudo, estando estas descritas na Tabela 6. Uma árvore filogenética NJ foi elaborada com as sequências de proteínas dos VT encontrados e dos EC descritos no banco de dados (Figura 9).

Tabela 6 - Polimorfismo de aminoácidos encontrados nos genes

VTS	Sítios de substituição de aminoácidos																									
	<i>dal</i>									<i>inlB</i>									<i>inlC</i>				<i>prfA</i>			
	43	49	69	77	78	79	80	82	120	27	50	52	66	69	75	101	118	124	125	1	15	46	78	123	138	124
ECI	D	P	D	T	I	A	K	N	N	K	N	S	M	A	A	L	R	G	E	L	K	V	M	R	D	Q
ECII	E	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.
ECIII	N	.	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	V	.	F	K	.	K	.	.	L	.	K	.	.
ECIV	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.
ECV	N	.	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
ECVI	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	V	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
ECVII	N	.	E	A	S	T	N	H	K	.	D	.	V	.	T	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
ECVIII	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	V	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
ECIX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.
ECX	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.
ECXI	N	T	E	A	S	T	N	H	K	.	.	N	V	V	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	E	.
VT11	N	T	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT14	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	K	.	N	.	.	.	.	.
VT45	N	T	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT59	N	T	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT68	N	T	E	A	S	T	N	H	K	.	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT94	.	.	E	.	.	.	S	.	.	.	.	N	V	V	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT107	N	T	E	A	S	T	N	H	.	.	.	N	V	V	.	F	K	.	K	.	.	L	I	K	.	.
VT184	.	.	E	.	.	.	S	.	K	.	.	N	V	.	T	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT185	N	T	E	A	S	T	N	H	.	H	.	N	V	.	.	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	.
VT186	N	T	E	A	S	T	N	H	K	.	.	N	V	.	T	.	.	.	K	.	.	L	.	K	.	S

Fonte: Do autor, 2018

Figura 9 - Árvore filogenética entre as sequências de genes traduzidos para proteínas de cada VT encontrado neste estudo com as sequências de genes traduzidos para proteínas dos EC descritos no banco. Todas as sequências foram concatenadas para a análise



EC – Clone Epidêmico

Gr. 1 - AL2735/06 - AL2875/06;

Gr. 2 - AL370/00 - AL2761/06;

Gr. 3 - AL544/91 - AL543/91 - AL1812/04;

Gr. 4 - HU74/11 - AL1808/04 - AL1809/04 - AL1811/04 - AL1812/04 - AL1917/04 - AL1968/04 - AL2747/06 - AL2760/06 - AL2777/06 - INCQS836/15;

Gr. 5 - AL874/98 - AL976/02 - AL1796/04 - AL1934/04 - 2381/05 - 2383/05 - 2384/05 - 2385/05 - 2386/05 - 2387/05 - AL2745/06 - AL2782/06 - AL74/15 - AL89/15 - AL90/15 - AL91/15 - AL92/15 - AL93/15 - AL94/15 - AL95/15 - AL96/15 - AL97/15 - AL98/15 - AL102/15 - INCQS834/15 - INCQS837/15 - INCQS838/15;

Gr. 6 - INCQS835/15 - INCQS833/15;

Gr. 7 - AL550/91 - AL554/91 - HU88/85

Fonte: Do autor, 2018

Alguns VT identificados apresentaram sequências idênticas às de clones epidêmicos já descritos, apesar de possuírem SNPs em relação a esses ECs. O VT107 apresentou a mesma proteína codificada pelo ECIII (VT1). Os VT11 e VT45 codificam os mesmos aminoácidos que o ECV (VT59). Foi observado que o VT14, que é classificado como o ECVIII, possui as mesmas sequências de aminoácidos codificadas pelo VT63, que é classificado como ECVI. Este resultado sugere uma maior conservação da sequência de aminoácidos codificadas por estes genes ao longo dos anos. Devido a este fato, há grandes possibilidades do VT14 codificar proteínas homologas a esses dois EC, sendo um potencial VT para causar surtos. O mesmo fato ocorre com os VT 45 e VT11 em relação ao ECV.

Zhang e colaboradores (2004) sugerem que a homologia das sequências de aminoácidos dos genes *clpP*, *lisR* e *prfA* sejam mais conservados devido ao fato destes genes serem responsáveis por funções importantes na virulência e sobrevivência intracelular. Ainda não é bem definido o quanto as diferenças filogenéticas de um EC contribuem para o desenvolvimento de listeriose. Chen e colaboradores (2007) demonstraram que cepas filogeneticamente relacionadas a EC também possuíam a capacidade de causar infecções em humanos. Sendo assim, VT que compartilham muitos alelos com EC podem ser potencialmente capazes de causar surtos. A identificação de VT filogeneticamente relacionados a EC pode indicar que estes também possuem potencial patogênico para causar infecções em humanos.

No presente estudo foram utilizadas amostras obtidas em uma grande faixa temporal (1978-2015). Devido à pouca pesquisa de diagnóstico clínico de listeriose poucas foram as amostras depositadas no banco de referência que pertenciam ao sorotipo 1/2a, sendo duas destas pertencentes aos depósitos com mais de 30 anos.

Contudo, por causa da pouca informação epidemiológica que existe hoje sobre listeriose no Brasil, este estudo é importante para analisar o perfil das cepas circulantes no país. Foi possível identificar que o VT59 caracterizado em uma amostra sanguínea (HU74/11), isolada em 2011, foi também identificado recentemente (2015) em uma amostra de alface crespa minimamente processada. O VT11, que foi identificado em uma amostra clínica de 1985 (HU88/85), apesar de não ter sido isolado em nenhuma amostra recente utilizada neste estudo, pertence a uma cepa que foi isolada em 2013 nos EUA (MULTI-VIRULENCE-LOCUS, 2013), o que demonstra sua constante e atual circulação pelo mundo.

## 5 CONCLUSÃO

- Foram identificados 10 VT, sendo três VT novos descritos no banco de dados: VT184, VT185 e VT186; e foram descritos dois alelos novos: *inlB43* e *prfA 33*;
- Foi observada uma relação de 5,3 cepas por VT e um valor SID de 0,698
- A identificação de cinco VT (VT11, VT14, VT45, VT59 e VT68), já associados a casos de infecções no mundo em cepas isoladas de alimentos prontos para o consumo no Brasil demonstra que estes podem representar um risco para saúde da população, principalmente dos indivíduos pertencentes aos grupos de risco (idosos, grávidas e imunossuprimidos);
- O VT186 foi um novo VT identificado de hemocultura;
- O VT11, apesar de ter sido identificado de amostra de hemocultura coletada em 1978 foi descrito mais recentemente nos EUA em indústria de alimentos, demonstrando que o VT continua em circulação;
- O VT59, também isolado de amostra de sangue e alimentos indicando que este pode estar atuando como veículo de contaminação para os casos de infecções no Brasil;

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa sinalizam para a Vigilância Sanitária e Epidemiológica do Brasil que cepas de EC de *L. monocytogenes* estão presentes em alimentos em diferentes Estados do Brasil. O agrupamento filogenético das amostras de hortaliças classificadas como VT14 sugere uma maior propensão destas cepas em causarem surtos, devido a presença de muitos EC filogeneticamente relacionados.

Um controle e investigação deste patógeno se faz necessário em casos clínicos e alimentos produzidos e comercializados no território nacional, para que se possa ter real conhecimento da disseminação deste patógeno para que medidas preventivas em relação a surtos e casos esporádicos possam ser estabelecidas.

## REFERÊNCIAS

- AANENSEN, D.M.; SPRATT, B.G. The multilocus sequence typing network: MLST. **Net. Nucleic Acids Research**. v.1, n.33, p. W728-733, 2005.
- AMATO, E. et al. Identification of a major *Listeria monocytogenes* outbreak clone linked to soft cheese in Northern Italy – 2009-2011. **BMC infectious diseases**, v.17, n. 1, p.342, 2017.
- BARANCELLI, G.V. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n.173, p. 21-29, 2014.
- BERGHOLZ, T.M. et al. Evolutionary relationships of Outbreak-Associated *Listeria monocytogenes* strains of serotypes 1/2a and 1/2b determined by whole genome sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 3, p. 928-938, 2015.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. Ed. Springer. 290p. 2008.
- BLUM-MENEZES D, et al. Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.46, n. 3, p.381–383, 2013.
- BRANDÃO, M. L. L.; et al. *Listeria monocytogenes* em hortaliças: isolamento e sorotipagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 72, n. 1, p. 116-21, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 Jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Nº 204, de 17 de fevereiro de 2016. 2016. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 32, 18 fev. 2016. Seção 1, p. 23.
- \_\_\_\_\_. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2017a. disponível em:< <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017> >. Acesso em: 23 jan. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamentação. **Agenda regulatória 2017-2020**. Brasília, DF. 2017b.

BREED, R. S.; MURRAY, E. G. D.; HITCHENS, A. P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: The William and Wilkins Co. 1948. 60 p.

BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J. B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 7, p.2584-2592, 1994.

BUENO, V. F. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 20, n. 1, p. 43-59, 2010.

BYRNE, V. V. et al. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n. 2, p.438-443, 2016.

CANTINELLI, T. et al. "Epidemic Clones" of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3770-3779, 2013.

CARPENTIER, B; CERF O. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n. 1. p. 1-8, 2011.

CARVALHO, F.; SOUSA, S.; CABANES, D. How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, n.48, 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Update**: multistate outbreak of listeriosis. 1999. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r990114.htm>>. Acesso em: 27 out. 2017.

\_\_\_\_\_. **Update**: listeriosis outbreak investigation. 2002. Disponível em:< <http://www.cdc.gov/od/oc/media/pressrel/r021121.htm>>. Acesso em: 27 out. 2017.

\_\_\_\_\_. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet)**. 2015. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2015.html> >. Acesso em: 15 set. 2016.

\_\_\_\_\_. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 US Sites, 1996-2012. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 62, n. 15, p. 283-287, 2013.

\_\_\_\_\_. *Listeria* outbreaks. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

\_\_\_\_\_. **Multistate outbreak of Listeriosis linked to soft raw milk cheese made by Vulto Creamery (Final Update)**. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html>>. Acesso em: 16 out. 2017.

CHEN, Y.; ZHANG, W.; KNABEL, J. Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 5291-5294, 2005.

CHEN, Y.; ZHANG, W.; KNABEL, S. J. Multi-Virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 835–846, 2007.

CHEN, Y.; KNABEL, S. Strain typing. In: LIU, D. (Ed.). **Handbook of *Listeria monocytogenes***. New York, NY: CRC Press, 2008.

CHEN, Y. et al. Core genome multilocus sequence typing for identification of globally distributed clonal groups and differentiation of outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 20, p. 6258-6272, 2016.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods: CAC/GL 61**, 2007.

\_\_\_\_\_. **Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods: CAC / GL 61-2007**. Disponível em: <[http://www.fao.org/input/download/standards/10740/CXG\\_061e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/10740/CXG_061e.pdf)>. Acesso em: 06 fev. 2018.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved?. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 8, p 373-377, 2004.

COTTER, P.D.; GUINANE, C.M.; HILL, C. The LisRK signal transduction system determines the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to nisin and cephalosporins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2784-2790, 2002.

CRUZ, C. D. et al. Epidemiological Survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 375-383, 2008.

CRUZ, C. D.; et al. *Listeria monocytogenes* associated with New Zealand seafood production and clinical cases: unique sequence types, truncated InlA, and attenuated invasiveness. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 4, p. 1489-1497, 2014.

DALTON, C. B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **The New England Journal of Medicine**, v.336, n. 2, p. 100-105, 1997.

DATTA, A. R.; LAKSANALAMAI, P.; SOLOMOTIS, M. Recent developments in molecular sub-typing of *Listeria monocytogenes*. **Food Additives and Contaminants Part A**, v. 30, n. 8, p. 1437-1445, 2013.

DEN BAKKER, H. C. et al. Lineage specific recombination rates and microevolution in *Listeria monocytogenes*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, p. 277-290, 2008.

DESTRO, M.T. ***Listeria monocytogenes* na cadeia produtiva de alimentos: da produção primária ao consumidor final.** 2006. 74 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006

DRAMSI, S. et al. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene Family. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 251-261, 1995.

DOUMITH M, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 8, p. 3819-3822, 2004.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Listeria infections in humans.** Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/listeria>>. Acesso em: 15 set. 2016.

\_\_\_\_\_. European Center for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, v.10, n.3, p. 1-442, 2012.

\_\_\_\_\_. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, 386 zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. **EFSA Journal**, n.11, p. 1-250, 2013.

ESPER, M. R. N. R. et. al. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.38, n.1, p.37-41, 1978.

*LISTERIA monocytogenes*. In: WALDERHAUG, Mark. **Bad bug book: foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins**. 2. ed.. Maryland, EUA: FDA, 2012.

Disponível em:

<<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>>.

Acesso em: 06 jan. 2017.

FORATTINI, O. P. **Conceitos básicos de epidemiologia molecular**. São Paulo: Edusp, 2005, 144 p.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 607 p.

GAILLOT, O. et al. The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1286-1294, 2000.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listerie* species. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 849-852, 2001.

GILMOUR, M. W. et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. **BMC Genomics**, v.11, n.120, 2010.

GILLOT, P.; GENICOT, A.; ANDRE, P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. **Journal of Clinical Microbiology**. v.34, n.4, p.1007-1010, 1996.

GRAVESEN, A. T. et al. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, n. 1-2, p. 43-51, 2000.

HALEY, B. J.; et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* within a U.S. dairy herd, 2004-2010. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 10, p. 844-850, 2015.

HALL, A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**. v. 4, n. 6, p. 423-434, 2006.

HENRI, C. et al. Population Genetic Structure of *Listeria monocytogenes* Strains as Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Multilocus Sequence Typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 8, p. 5720-5728, 2016.

HERLER, M. et al. Positive selection of mutations leading to loss or reduction of transcriptional activity of PrfA, the central regulator of *Listeria monocytogenes* virulence. **Journal of Bacteriology**. v. 183, p. 5562-5570, 2001.

HOFER, E.; MENEZES, D. M. F. Isolamento de *Listeria monocytogenes* em secreção vaginal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1., 1969, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, p.158, 1969.

HOFER, E.; REIS, C. M. F.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p. 32-37, 2006.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical Index of the Discriminatory Ability of Typing Systems: an Application of Simpson's Index of Diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

INSTITUT PAUSTEUR. INSTITUT PAUSTEUR. **Listeria sequence typing**. Disponível em: <<http://bigsd.db.pasteur.fr/listeria/>> Acesso em: 06 fev. 2018.

JACKSON, K. A., et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. **Journal of Food Protection**. v.74, n.6, p. 949–953. 2011.

JADHAV, S., BHAVE, M., PALOMBO, E.A. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v.88, n.3, p.327-341, 2012.

JAY, James. M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JENSEN, A.K. et al. Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009. **Euro Surveillance** v.15, n. 12, pii:19522, 2010.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1811-1829, 2002.

KNABEL, S. et al. Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988-2010. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1748-1751, 2012.

KIRK, M.D. et al. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. **PLoS Medicine**, v.12, n.12, p. e1001921, 2015.

LANDGRAF, I. M. et al. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1216–1225, 2007.

LEMES-MARQUES, E.G; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno-and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 287-292, 2007.

LEUNG, N. et al. Impact of the *Listeria monocytogenes* protein InlC on infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1334–1340, 2013.

LIST of prokaryotic names with standing in nomenclature. 2017. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/listeria.html>>. Acesso em: 01 fev. 2017.

LIU, D. Epidemiology. In: Liu D, editor. **Handbook of *Listeria monocytogenes***. Dongyou Liu. p. 27–60, 2008.

LIU, D. Molecular Approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic *Listeriae*. **Review Microbiology Insights**, v. 6, p. 59–69, 2013.

LOMONACO, S.; CHEN, Y.; KNABEL, S.T. Analysis of additional virulence genes and virulence gene regions in *Listeria monocytogenes* confirms the epidemiologic relevance of

multi-virulence-locus sequence typing. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 12, p. 2559-2566, 2008.

LOMONACO, S. et al. Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 19, n. 1, p. 147-150, 2013.

LOMONACO; S.; NUCERA, D.; FILIPELLO, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infection, genetics and evolution**. v.35, p172-83, 2015.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 3, p.3140–3145, 1998.

MAMMINA, C. et al. Enhanced surveillance of invasive listeriosis in the Lombardy region, Italy, in the years 2006-2010 reveals major clones and an increase in serotype 1/2a. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 152, 2013.

MARINI, E. et al. Ongoing outbreak of invasive listeriosis due to serotype 1/2a *Listeria monocytogenes*, Ancona province, Italy, January 2015 to February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, 2016.

MARTÍN, B. et al. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. **Food Microbiology**, v.44, p. 119-127, 2014.

MIYA, S. et al. Genetic Characteristics of Japanese Clinical *Listeria monocytogenes* Isolates. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p.e0122902, 2015.

MULTI-VIRULENCE-LOCUS sequence typing. 2013. Disponível em:  
<<https://sites.google.com/site/mvlstdatabase/home>> Acesso em: 26 out. 2018.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, p. 407-439, 1926.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases: the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S13-S15, 2010. Supl. 1.

NOORDHOUT, C. M. et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet**, v. 14. n. 11. p. 1073-1082, 2014.

OJENIYI, B. et al. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 4, p. 395-401, 1996.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Segurança alimentar é tema do Dia Mundial da Saúde 2015**. Disponível em:

<[http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com\\_content&view=article&id=281:seguranca-alimentar-e-tema-do-dia-mundial-da-saude-2015&catid=15&Itemid=206](http://www.paho.org/bireme/index.php?option=com_content&view=article&id=281:seguranca-alimentar-e-tema-do-dia-mundial-da-saude-2015&catid=15&Itemid=206)> . Acesso em: 01 fev. 2017.

ORSI, R.H.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic Characteristics. Mini review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301, n. 2, p. 79–96, 2011.

OTTO, T.D. et al. ChromaPipe: A pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 3, p.861-871, 2008.

PISTOR, S. et al. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. **The Embo Journal**, v. 13, n. 4, p. 758-763, 1994.

POPOVICH, K. J.; SNITKIN, E. S. Whole genome sequencing-implications for infection prevention and outbreak investigations. **Current Infectious Disease Reports**, v. 19, n. 4, p. 15, 2017

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA. **Outbreak of Listeria infections linked to packaged salad products produced at the dole processing facility in Springfield, Ohio**. Mar. 2016. Disponível em: <<http://www.phac-aspc.gc.ca/phn-asp/2016/listeria-eng.php>>. Acesso em: 15 set. 2016.

ROCHA, P. R. D. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 9, p. 3059-3066, 2013.

ROCOURT, J. et al. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. **Lancet**, v. 2, n. 8673, p.1217-1218, 1989.

ROSAS, C. O.; BRANDÃO, M. L. L.; LOPES, S. M. R. Ações e estratégias da vigilância epidemiológica. In: SANT'ANA, Anderson de Souza (Ed.). **Coleção ciência, tecnologia, engenharia de alimentos e nutrição: inocuidade dos alimentos**. - Rio de Janeiro: Atheneu, 2017. v. 1, cap. 4, p. 51-64. ISBN 978-85-388-0735-3.

ROZAS, J. et al. **DnaSP: DNA sequence polymorphism**. Universitat de Barcelona. 2017.

SANT'ANA, A. S. et al. Prevalence, populations and pheno and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. :1–9, 2012.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação imunohistoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 7, p.501-505, 2003.

SCHWARTZ, B. et al. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 4, p. 680-685, 1989.

SEELIGER, H.P.R; HÖHNE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. **Methods in Microbiology**, v. 13, p. 31-49, 1979.

SILVA, A. S. et al. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: uma revisão. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.

SILVA, D. A. F. **Análise microbiológica de amostras de queijo minas frescal comercializadas no estado do Rio de Janeiro**. Trabalho de conclusão do curso (Especialista em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

SILVA, D. A. F. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e identificação dos sorovares em alimentos prontos para o consumo comercializados no estado do Rio de Janeiro. **Revista Científica UBM**, RJ, v. 19, n. 36, p. 47-60, 2017.

SMITH, B. et al. Outbreak of listeriosis caused by infected beef meat from a mealson-wheels delivery in Denmark 2009. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.50-52, 2011.

SMITH, J. M.; FEIL, E. J.; SMITH, N. H. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. **BioEssays**, v. 22, n. 12, p. 1115–1122, 2000.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 29., 2017, Foz do Iguaçu, PR. **Programação**. São Paulo, 2017.

Disponível em:

<[http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/admin/pro\\_lista\\_programa.asp?eveId=15&arsId=91](http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/admin/pro_lista_programa.asp?eveId=15&arsId=91)>. Acesso em: 13 nov. 2017.

STRUELENS, M. J. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v.2, n. 1, p. 2-11, 1996.

SUASSUNA, I. et al. Listeriose do sistema nervoso no Estado da Guanabara. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1., 1969, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: SBM, p.161, 1969.

SWAMINATHAN, B. et al. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. **Food Microbiology: fundamental and frontiers**. Washington, DC: ASM Press, 2007, 1038p.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

TAMURA, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 6.0. **Molecular biology and evolution**. v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013

TASARA, T. et al. Genome sequences of *Listeria monocytogenes* strains responsible for cheese- and cooked ham product-associated Swiss listeriosis outbreaks in 2005 and 2011. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p.e00106-e00116, 2016.

TILNEY, L. G.; TILNEY, M. S. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. **Trends in Microbiology**, v.1, n.1, p.25-31, 1993.

THOMPSON, R. J. et al. Pathogenicity and immunogenicity of a *Listeria monocytogenes* strain that requires D-Alanine for growth. **Infection And Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3552-3561, 1998.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.; CAE, C.L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed. 2017. Cap. 22, p. 614-616.

UNIÃO EUROPEIA. Commission Regulation (EC). N.º 2073/2005, 15 de novembro de 2005. **Official Journal of the European Union**. Bruxelas, 15 nov. 2005.

VALLIM, D.C. et al. Twenty years of *Listeria* in Brazil: occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 8, 2015.

VASCONCELOS, R. M. et al. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 8, p. 836-838, 2008.

VERA, A. et al. Principales factores de virulência de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista chilena de infectología**, v. 30, n. 4, p. 407-416, 2013.

VERGHESE, B. et al. *comK* Prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 3279-3292, 2011.

WIEDMANN, M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.

WIEDMANN, M. et al. A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v.65, n.7, p.2707-2716, 1997

WU, S. et al. Analysis of multilocus sequence typing and virulence characterization of *listeria monocytogenes* isolates from chinese retail ready-to-eat food. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 168, 2016.

YIN, Y. et al. Geographical and longitudinal analysis of *Listeria monocytogenes* genetic diversity reveals its correlation with virulence and unique evolution. **Microbiological Research**, v. 175, p. 84-92, 2015.

ZHANG, W.; JAYARAO; B.M.; KNABEL, S.J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.2, p.913-920, 2004.

ZHANG , J. et al. Evolution and Diversity of *Listeria monocytogenes* from Clinical and Food Samples in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1138, 2016.