

ANDERSON CARLOS CAMARGO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DE *Listeria monocytogenes* OBTIDOS EM UMA PLANTA DE
PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C172c
2013

Camargo, Anderson Carlos, 1989-
Caracterização fenotípica e molecular de isolados de
Listeria monocytogenes obtidos em uma planta de
processamento de carne bovina / Anderson Carlos Camargo. –
Viçosa, MG, 2013.
xii, 73 f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.
Orientador: Luis Augusto Nero.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Carne bovina. 3. Virulência.
4. Eletroforese. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

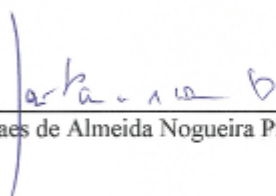
CDD 22. ed. 636.213

ANDERSON CARLOS CAMARGO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
DE *Listeria monocytogenes* OBTIDOS EM UMA PLANTA DE
PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

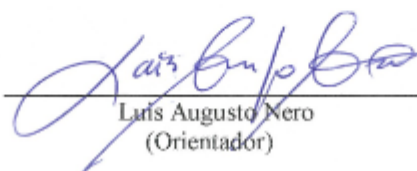
APROVADA: 18 de julho de 2013.



José Paes de Almeida Nogueira Pinto



Paulo Sérgio de Arruda Pinto
(Coorientador)



Luís Augusto Nero
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos meus pais Edmilson e Rivanda que sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Agradeço a todos os colegas dos laboratórios de Inspeção de Produtos de Origem Animal e Biologia Molecular que contribuíram para a realização deste trabalho, e ao meu orientador prof. Nero pelo apoio e incentivo nestes últimos dois anos.

Finalmente, agradeço ao CNPq, CAPES, e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

CONTEÚDO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i>	2
2. Epidemiologia de <i>Listeria monocytogenes</i>	6
3. Contaminação em carne bovina	10
Referências bibliográficas	12
OBJETIVOS	19
Objetivo geral.....	19
Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 01. Serotype diversity of <i>Listeria monocytogenes</i> in a beef processing facility: identification of a novel serotype variant	20
Title page.....	21
Abstract	22
1. Introduction	23
2. Material and Methods	24
2.1. Sampling	24
2.2. <i>Listeria</i> spp. detection	25
2.3. Serology and sequencing.....	25
3. Results and Discussion.....	26
Acknowledgments.....	29
References	29
CAPÍTULO 02. Caracterização dos perfis genéticos e resistência a antimicrobianos de <i>Listeria monocytogenes</i> obtidos de um ambiente de processamento de carne bovina	36
Página título	37
Resumo.....	38
1. Introdução	39
2. Material e Métodos	41
2.1. Isolados de <i>L. monocytogenes</i>	41

2.2. Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE).....	41
2.3. Genes de virulência	42
2.4. Resistência a antimicrobianos	43
3. Resultados e Discussão	44
Agradecimentos.....	49
Referências	49
CONCLUSÕES	58
ANEXOS	59
Metodologia	60
Coleta de amostras	60
Isolamento de <i>Listeria</i> spp. e <i>L. monocytogenes</i>	60
Reativação de culturas e extração do DNA.....	61
Sorotipagem molecular e detecção de genes relacionados à patogenicidade	62
Sequenciamento dos produtos atípicos obtidos pela sorologia molecular	63
Caracterização por PFGE.....	65
Resistência a antimicrobianos	65
Resultados Detalhados	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Multiplex PCR profiles for serotyping of *Listeria* spp. strains included in the present study, demonstrating the distinct combination of amplification products for *prs* (370 bp), *ORF2819* (471 bp), *ORF2110* (597 bp), *lmo0737* (691 bp), and *lmo1118* (906 bp). M: 100 bp DNA ladder (Promega Corp., Madison, WI, USA), line 1: *L. monocytogenes* 1/2a, line 2: *L. monocytogenes* 1/2c, line 3: *L. monocytogenes* 1/2b, line 4: *L. monocytogenes* 4b, line 5: *L. monocytogenes* IVb-v1, line 6: *L. monocytogenes* novel serotype variant, line 7: *Listeria innocua* (*Listeria* spp. control), line 8: negative control of PCR.35

CAPÍTULO 2

Figura 1. Dendograma dos perfis de digestão enzimática obtidos por *ApaI* e *AscI* e PFGE de 96 isolados de *Listeria monocytogenes*, seus locais de isolamento, sorotipos, identificação e visitas em que foram obtidos de um ambiente de processamento de carne bovina localizado no Estado de Minas Gerais, Brasil.....57

ANEXOS

Figura1. Produtos da reação de PCR multiplex para detecção dos genes *inlA* (800bp), *inlC* (517 bp), *inlJ* (238bp).....73

Figura 2. Produtos da reação de PCR convencional para detecção do gene *inlB* (884). 73

Figura 3. Produtos da reação de PCR multiplex para detecção dos genes *actA* (839 bp), *hlyA* (456 bp), *iap* (131 bp).73

Figura 4. Produto da reação de PCR convencional para detecção do gene *plc* (1484 bp).
.....73

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Características bioquímicas de <i>Listeria</i> spp.	4
Tabela 2: Divisão de linhagens de <i>L. monocytogenes</i>	5

CAPÍTULO 1

Table 1. Frequencies of positive results for <i>Listeria</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> , and <i>L. seeligeri</i> from surface samples of beef cuts and an beef processing environment from a slaughtering located in Minas Gerais State, Brazil.	33
Table 2. Numbers of obtained <i>Listeria monocytogenes</i> isolates from environmental samples (frequencies of positive results) from a beef processing facility located in Minas Gerais State, Brazil, and their serotype diversity characterized by multiplex PCR, according Doumith et al. (2004).	34

CAPÍTULO 2

Table 1. Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> obtidos em uma planta de processamento de carne bovina localizada no Estado de Minas Gerais, Brasil.	54
Tabela 2. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) de substâncias antimicrobianas sobre 20 isolados selecionados de <i>Listeria monocytogenes</i> (perfis genéticos por PFGE, Figura 1) e seus respectivos perfis de resistência (R: resistente, S: susceptível, I: resistência intermediária).	55

ANEXOS

Tabela 1. Detalhes sobre primers, genes alvos e condições das reações de PCR para sorotipagem e detecção de genes de virulência de <i>L. monocytogenes</i>	64
Tabela 2: Detalhes sobre os resultados dos testes bioquímicos para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i>	67
Tabela 3: Detalhes sobre os resultados da PCR multiplex para sorotipagem de <i>Listeria monocytogenes</i>	69
Tabela 4: Detalhes sobre os resultados das reações de PCR para detecção dos genes de virulência.	71

RESUMO

CAMARGO, Anderson Carlos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos em uma planta de processamento de carne bovina.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar frequentemente associado à carne bovina e produtos cárneos. A presença de *L. monocytogenes* em cortes cárneos normalmente está associada a contaminações cruzadas durante o processamento, já que esta bactéria está naturalmente presente no ambiente industrial. O consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente alimentos prontos para consumo, pode causar a listeriose, considerada uma doença grave que acomete principalmente indivíduos de grupos de risco como gestantes, crianças, idosos e adultos imunocomprometidos, levando a uma alta taxa de mortalidade (20 a 30%) nos casos de infecção sistêmica. A listeriose é considerada uma doença rara, mas *L. monocytogenes* tem sido alvo de muitas pesquisas nas últimas décadas devido à severidade da doença, da alta taxa de mortalidade e aos prejuízos econômicos causados. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de carne bovina e cortes cárneos e caracterizar por técnicas fenotípicas e moleculares os isolados obtidos. Um total de 272 amostras de ambiente, utensílios e cortes cárneos foi analisado entre os anos de 2009 e 2012, todas coletadas em um frigorífico localizado no Estado de Minas Gerais. Todas as amostras foram obtidas por swab superficial (400 cm²) e submetidas à detecção de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* pelos protocolos ISO 11290-1 e ISO 11.290-2 (2004) e isolados suspeitos foram submetidos a identificação bioquímica, sorotipagem molecular, sequenciamento dos produtos atípicos, eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), detecção de genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*) e testes de resistência a antimicrobianos. *Listeria* spp foi identificada em 61 (22.4%) das amostras analisadas, *L. monocytogenes* em 23 (8.5%), *L. innocua* em 46 (16.9%), e *L. seeligeri*

em 1 (0.37%). Um total de 231 isolados foi obtido e identificado como *L. monocytogenes* (n = 96), *L. innocua* (n = 129), *L. seeligeri* (n = 6). Entre os isolados de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2c ou 3c foi o mais prevalente (74/96), estando presente em 21/23 amostras, seguido pelo sorotipo 4b atípico (15/96) e sorotipo 1/2b, 3b ou 7 (7/96). PFGE mostrou a diversidade genética entre os isolados e indicou possíveis rotas de contaminação dentro do ambiente de processamento de carne bovina. Os 96 isolados foram agrupados em 6 grupos subdivididos em 20 pulsotipos através da combinação dos padrões de restrição das enzimas *ApaI* e *AscI*. Diferentes sorotipos compartilharam mesmos grupos genéticos, mas não o mesmo pulsotipo. Ainda foi verificado que isolados recuperados de diferentes origens apresentaram mesmo perfil genético, e alguns isolados obtidos em diferentes visitas também foram agrupados no mesmo pulsotipo. Todos os genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*) investigados foram detectados em todos os isolados de *L. monocytogenes*. De maneira geral, os 20 isolados testados (um representante de cada pulsotipo) apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos, entretanto 19 isolados foram resistentes a sulfametoxazole e dois também foram resistentes a trimetopim. Outros dois isolados apresentaram múltipla resistência (gentamicina, tobramicina, clindamicina, trimetoprim, e sulfametoxazole) e oito mostraram resistência intermediária a eritromicina. Os dados obtidos indicam a persistência de cepas de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de carne bovina, possíveis rotas de contaminação, e a ocorrência de isolados multi-resistentes a antimicrobianos usualmente utilizados no tratamento de listeriose.

ABSTRACT

CAMARGO, Anderson Carlos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from a beef processing facility.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen often associated to beef cuts and meat products. Its presence in beef cuts is usually related to cross contamination during processing, once *L. monocytogenes* is naturally part of its environmental microbiota. The consumption of food contaminated with this pathogen, mainly ready-to-eat products, can determine listeriosis, a severe disease specially to risk groups such as pregnant women, children, elderly, and immune-compromised adults, leading to mortality rates of 20 to 30% in cases of systemic infection. Despite listeriosis being considered as an infrequent disease, its high severity and mortality and consequent economic losses determine a wide range of studies focusing on *L. monocytogenes*. The present study aimed the assessment of the occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in a beef processing plant and beef cuts, and the characterization of the obtained isolates by phenotypic and molecular methodologies. A total of 272 environmental, utensils and beef cuts samples was collected between 2009 and 2012 in a slaughterhouse located in Minas Gerais state, Brazil. Samples were obtained by surface swabbing (400 cm²) and subjected to *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* detection according protocols ISO 11290-1 and ISO 11290-2. Suspect isolates were subjected to biochemical identification, molecular serotyping, sequencing of atypical PCR products, pulsed field gel electrophoresis (PFGE), detection of virulence genes by PCR (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap*), and phenotypic tests of antimicrobials resistance. *Listeria* spp. was identified in 61 samples (22.4%), being *L. monocytogenes* in 23 (8.5%), *L. innocua* in 46 (16.9%), and *L. seeligeri* in 1 (0.37%). A total of 231 isolates was obtained and identified as *L. monocytogenes* (96), *L. innocua* (129), and *L. seeligeri* (6). Among *L. monocytogenes* isolates, 1/2c or 3c serotype was

the most prevalent (74/96), being present in 21 of the 23 positive samples; 15 isolates were identified as serotype 4b atypical and 7 as serotype 1/2b, 3b or 7. PFGE demonstrated the genetic diversity of the isolates and indicated possible contamination routes in the beef processing environment. The isolates were clustered in 6 major groups and 20 pulsetypes after macro-restriction by *ApaI* and *AscI*. Isolates with distinct serotypes were grouped in same groups, but never in a same pulsetype. Isolates obtained from distinct samples presented identical genetic profile, as observed in isolates obtained from distinct sampling visits. All tested virulence genes were identified in all *L. monocytogenes* isolates. Based on PFGE, 20 isolates were selected and tested by phenotypic tests to identify their resistance profiles against 15 antimicrobials; the isolates presented sensitivity to all tested antimicrobials, but 19 isolates were resistant to sulfamethoxazole and 2 also to trimethoprim. Other 2 isolates presented multidrug resistance (gentamicin, tobramycin, clindamycin, trimethoprim, and sulfamethoxazole) and 8 isolates presented intermediary resistance to erythromycin. The obtained data indicate the persistence of *L. monocytogenes* strains in the beef environment processing of the studied slaughterhouse, possible contamination routes, and the occurrence of multi-drug resistant isolates, to antimicrobials usually considered in the listeriosis treatment.

INTRODUÇÃO

L. monocytogenes é uma bactéria que está amplamente distribuída no meio ambiente e já foi recuperada de água, solo, superfície de vegetais, esgoto, silagem, fezes de animais, ambientes industriais, equipamentos utilizados durante o processamento de alimentos e alimentos. Esta bactéria pode causar a listeriose, uma doença severa que acomete principalmente indivíduos de grupos de risco como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pacientes imunocomprometidos. *L. monocytogenes* pode levar a quadros de bacteremia e infecções do sistema nervoso central e possui destaque pela sua alta taxa de mortalidade (entre 20% e 30%).

Esta bactéria já foi detectada em uma variedade de alimentos como leite e derivados, carne bovina, suína, de aves e organismos aquáticos e diversos casos esporádicos e surtos de listeriose já foram relacionados com alimentos de origem animal. Esse patógeno está naturalmente presente no ambiente de processamento de carne bovina e pode contaminar utensílios e equipamentos utilizados nas operações industriais. Também está naturalmente presente no couro e fezes de bovinos e a sua presença em carcaças bovinas está usualmente associada a contaminações cruzadas durante o processo de abate.

L. monocytogenes pode persistir no ambiente industrial devido a sua capacidade de formação de biofilmes em diferentes superfícies. A contaminação de produtos finais, principalmente alimentos prontos para consumo normalmente ocorre por contaminação cruzada e representa um risco para a população consumidora. Dessa forma, estudos que visam identificar as origens da contaminação por *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de carne bovina são importantes para que sejam tomadas as medidas adequadas visando o controle da contaminação e garantia da qualidade dos produtos destinados ao consumo humano.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*

Convencionalmente, o gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. grayi*. Recentemente outras três espécies foram descritas: *L. weihenstephanensis* (Halter et al., 2013), *L. marthi* (Graves et al., 2010) e *L. rocourtiae* (Leclercq et al., 2010). No entanto, apenas duas espécies são reconhecidamente patogênicas: *L. monocytogenes*, que pode infectar uma variedade de espécies animais, incluindo o homem e *L. ivanovii*, que possui importância epidemiológica restrita aos ruminantes (Jay et al., 2005; Vázquez-Boland et al., 2001).

Listeria spp. são bacilos Gram-positivos, com diâmetro de aproximadamente 0,4 a 0,5µm e comprimento de 0,51 a 2,0 µm. São anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos e apresentam motilidade característica em forma de “guarda chuva” quando incubados entre 20 a 25°C. As colônias apresentam-se acinzentadas brilhantes sob iluminação normal e de coloração azul esverdeada quando observadas sob iluminação oblíqua (Rocourt and Buchrieser, 2007; Schuchat et al., 1991). São catalase positivos, oxidase negativos e a faixa ótima de pH para sua multiplicação é de 6 a 8. A temperatura ótima de multiplicação situa-se na faixa de 30 a 37°C, embora já tenha sido observada sua multiplicação em temperaturas entre 1°C e 45°C. As espécies do gênero são capazes de se multiplicar em baixas temperaturas e essa característica faz da *L. monocytogenes* um patógeno reconhecido como psicotrófico. O congelamento a -18°C e descongelamentos sucessivos também não capazes de inativar *L. monocytogenes* (Cole et al., 1990; Jay et al., 2005; Schuchat et al., 1991). Esta bactéria é capaz de hidrolisar a esculina e se desenvolver na presença de 10% e até mesmo 40% de bile e em

concentrações salinas de até 10%. Embora o ferro seja importante para o seu desenvolvimento *in vivo*, *L. monocytogenes* aparentemente não possui compostos específicos de ligação e esse íon seria obtido, quando necessário, a partir da redução do ferro livre que se liga a receptores de superfície. As exigências nutricionais para a multiplicação de *Listeria* spp. são praticamente as mesmas das outras bactérias Gram-positivas, se desenvolvendo bem em meios comuns como infusão de coração e cérebro e ágar tripticase de soja (Jay et al., 2005).

A classificação das espécies é baseada na fermentação de alguns açúcares como D-glucose, D-xilose, D-manitol e L-rhamnose e na reação de hemólise (Tabela 1). *L. monocytogenes* apresenta reação de β -hemólise quando cultivada em ágar sangue ovino ou eqüino, formando uma estreita zona de hemólise ao redor da colônia (Seeliger and Jones, 1986). A diferenciação entre as espécies hemolíticas é feita através do teste Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP teste). O CAMP teste detecta reações sinérgicas de hemolisinas de *Listeria* spp. com a beta toxina de *Staphylococcus aureus* e com o exofator de *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* apresenta reação positiva com *S. aureus*, mas negativa com *R. equi*; *L. ivanovii* apresenta reação inversa (Tabela 1) (McKellar, 1994).

L. monocytogenes está subdividida em sorotipos baseados em proteínas de superfície (antígenos somáticos e flagelares). Atualmente treze sorotipos de *L. monocytogenes* já foram identificados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), sendo que, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b estão envolvidos em mais de 95% dos casos de listeriose humana (Doumith et al., 2004; Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007).

Tabela 1. Características bioquímicas de *Listeria* spp.

Características bioquímicas	Espécies					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-hemólise em ágar sangue	+	++	-	-	(+)	-
Redução do nitrato a nitrito	-	-	-	-	-	-
CAMP teste com <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	(+)	-
CAMP teste com <i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-
Produção de ácido a partir de:						
D-manitol	-	-	-	-	-	+
L-rhamnose	+	-	V	V	-	-
D-xilose	-	+	-	+	+	-
α-metil D-manosídeo	+	-	+	+	V	NE

+ = reação positiva; ++ = reação positiva forte; (+) = reação positiva fraca; (-) = reação negativa
NE = não estabelecido

As cepas de *L. monocytogenes* estão agrupadas em três linhagens filogenéticas, diferenciadas por técnicas como “*ribotyping*”, “*pulse-field gel electrophoresis*” (PFGE) e “*multilocus sequence typing*” (MLST). O seqüenciamento de DNA com base de dados (por exemplo, por MLST) é necessário para a caracterização filogenética de isolados e atribuição precisa das linhagens (Brosch et al., 1994; Doumith et al., 2004; Graves et al., 1994; Orsi et al., 2011; Ragon et al., 2008; Wiedmann et al., 1997). Os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e constituem a linhagem I; os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c constituem a linhagem II; e os sorotipos 4a, 4c e 4b atípico formam a linhagem III; (Ward et al., 2008; Ward et al., 2004). Recentemente uma nova linhagem foi descrita (linhagem IV), que é representada também pelos sorotipos 4a, 4c e 4b atípico, mas é raramente encontrada (Tabela 2) (Orsi et al., 2011; Ward et al., 2008).

Tabela 2: Divisão de linhagens de *L. monocytogenes*.

Linhagem	Primeira identificação	Sorotipos	Características genéticas	Distribuição
I	Piffaretti et al. (1989)	1/2b, 3b, 3c, 4b	Menor diversidade entre as linhagens; menor nível de recombinação entre as linhagens	Isolados de várias fontes, são os principais isolados de origem humana
II	Piffaretti et al. (1989)	1/2a, 1/2c, 3a	Maior diversidade; maior nível de recombinação	Isolados de várias fontes, principalmente alimentos e fontes ambientais
III	Rasmussen et al. (1995)	4a, 4b atípico, 4c	Muito diversas; níveis de recombinação entre aqueles para linhagem I e linhagem II	Maioria dos isolados obtidos de ruminantes
IV	Inicialmente descrita como IIIB usando sequência parcial de análises de dados por Roberts et al., (2006); Relatada pela primeira vez como linhagem IV por Ward et al. (2008)	4a, 4b atípico, 4c	Poucos isolados analisados até a data	Maioria dos isolados obtidos de ruminantes

Fonte: Orsi, Bakker et al. (2011).

Uma importante característica patogênica de *L. monocytogenes* é sua capacidade de invadir macrófagos e uma variedade de células não fagocíticas, como as endoteliais, hepatócitos, fibroblastos e células endoteliais do sistema nervoso central. No caso de células não fagocíticas, o processo é disparado pela bactéria e denominado de fagocitose induzida. Estudos realizados com *L. monocytogenes* em cobaias indicaram que a invasão de enterócitos e/ou das células M das placas de Peyer, constitui a primeira etapa para atravessar a barreira intestinal. As bactérias são então internalizadas por macrófagos da lâmina própria alcançando a corrente linfática, a circulação sanguínea e atingindo o fígado e o baço. Em camundongos, a infecção do fígado começa por uma fase inicial durante a qual as bactérias são rapidamente fagocitadas pelas células de Kupffer, os macrófagos do fígado, sendo que em menos de 6 horas são eliminadas 90%

das bactérias. Os micro-organismos que sobrevivem infectam os hepatócitos adjacentes, iniciando uma infecção sistêmica (Ireton and Cossart, 1997).

A maneira singular que *L. monocytogenes* apresenta para colonizar o hospedeiro humano, utilizando células do sistema fagocitário para distribuir-se no organismo por dispersão célula-à-célula, faz parte de um intrincado mecanismo de regulação genética, que difere das condições às quais as células estavam submetidas nos alimentos que as originaram (Chaturongakul et al., 2008). A entrada nas células é mediada por duas proteínas de superfície que interagem com receptores específicos das células hospedeiras, provocando a fagocitose (internalinas inlA e inlB). Após a internalização outras proteínas ajudam a bactéria a escapar do fagossomo formado durante o processo (listeriolisina O, fosfolipases plcA e plcB), na replicação bacteriana no citoplasma da célula hospedeira (açúcar fosfato permease Hpt) e difusão para células adjacentes (actA e inlC), onde o ciclo se inicia novamente (Vázquez-Boland et al., 2001). Todos os genes que codificam para estas proteínas estão localizados em uma região conhecida como “ilha de patogenicidade de *Listeria 1*” (LIPI-1) regulada por uma proteína codificada pelo regulon PrfA. Os genes que codificam para estes fatores de virulência são expressos sob coordenação de um controle positivo do PrfA. A fim de evitar expressão desnecessária no ambiente, o PrfA regulon é seletivamente ativado durante a infecção na célula hospedeira (de las Heras et al., 2011).

2. Epidemiologia de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um micro-organismo ubíquo, podendo ser isolado do solo, água, silagem, plantas e outras fontes ambientais (Carpentier and Cerf, 2011; Dykes and Moorhead, 2000; Jay et al., 2005; Sauders et al., 2012). Em humanos pode ser recuperada de indivíduos assintomáticos (Grif et al., 2003) e alguns estudos sugerem

que até 21% dos humanos podem ser portadores desta bactéria nos intestinos (Mascola et al., 1992; Schuchat et al., 1991; Slutsker and Schuchat, 1999). *L. monocytogenes* já foi isolada de pelo menos 42 espécies de mamíferos, tanto domésticos quanto silvestres, assim como em pelo menos 22 espécies de pássaros e também em algumas espécies de peixes e moluscos (Destro, 2000; Rocourt et al., 2000; Ryser and Marth, 2007). Devido à natureza deste patógeno, muitos produtos alimentícios podem ser contaminados durante o processamento e a principal forma deste micro-organismo chegar aos produtos finais é pela contaminação cruzada. Vários estudos mostram a presença de *L. monocytogenes* em diversos alimentos como leite e derivados, carne bovina, suína, de aves, pescados, embutidos e vegetais (Korsak et al., 2012; Kramarenko et al., 2013; Miyasaki et al., 2009; Sant'Ana et al., 2012; Wieczorek et al., 2012).

A eliminação de *L. monocytogenes* de ambientes industriais é sabidamente difícil pela sua conhecida resistência a agentes antimicrobianos e outras substâncias químicas, como ácidos e álcalis. Entretanto, a capacidade de adesão e consequente formação de biofilmes é o que leva à persistência de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos (Dykes and Moorhead, 2000; Lee Wong, 1998; Møretrø and Langsrud, 2004). Esse micro-organismo possui comprovada capacidade de adesão em superfícies de diferentes tipos de materiais, como borracha, plástico, vidro e aço inoxidável (Beresford et al., 2001; Gandhi and Chikindas, 2007).

O desenvolvimento de biofilmes pode ser estimulado por diferentes fatores ambientais sobre as células bacterianas. Situações de stress, como baixa disponibilidade de nutrientes, baixas temperaturas e contato com sanitizantes, são consideradas importantes para o desenvolvimento de biofilmes (Jefferson, 2004). Os mecanismos de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* são basicamente os mesmos usualmente “utilizados” por outros microrganismos (Gandhi and Chikindas, 2007; Møretrø and Langsrud, 2004). De forma bastante simplificada, ocorre uma adesão inicial de bactérias

em superfícies, desenvolvimento de micro-colônias, produção de exopolissacarídeos e maturação dos biofilmes (Chmielewski and Frank, 2003). Entretanto, em relação a *L. monocytogenes* a capacidade de adesão em ambientes de processamento de carne bovina está associada às condições de sobrevivência do patógeno, sendo que situações favoráveis a sua multiplicação estimulam sua adesão e persistência nesses locais (Galvão et al., 2012).

O primeiro surto de listeriose de origem alimentar na América do Norte aconteceu em 1981 em Nova Escócia, Canadá, com 41 doentes e 11 mortes. Este surto foi relacionado com a ingestão de salada contendo repolho contaminado a partir de adubo *in natura* proveniente de ovinos (Schlech III et al., 1983). Em 1983 também ocorreu um surto em Boston, nos Estados Unidos, com 49 casos e 14 mortes, que foi epidemiologicamente ligado a leite pasteurizado (Fleming et al., 1985). Em 1985 um grande surto ocorreu no sul da Califórnia, Estados Unidos, com 142 casos e 48 mortes, e foi causado por um tipo de queijo de massa mole, denominado *Mexican-style*, produzido a partir de leite cru ou proveniente de processo de pasteurização inadequada (Linnan et al., 1988). Com relação à listeriose causada por ingestão de produtos cárneos contaminados, o primeiro surto comprovado envolveu um tipo de patê importado pelo Reino Unido com 366 doentes e 63 mortes (McLauchlin et al., 1991), e o primeiro relato nos Estados Unidos foi de um caso esporádico relacionado ao consumo de embutido de carne de peru, por uma paciente com câncer (Barnes et al., 1989). Estudos mais recentes mostraram que muitos produtos cárneos e ambientes de plantas de processamento têm sido associados à contaminação por *L. monocytogenes* em diversos países (Barros et al., 2007; da Rocha et al., 2012; Korsak et al., 2012; Okada et al., 2011; Peccio et al., 2003; Williams et al., 2011).

L. monocytogenes possui capacidade natural de contaminar produtos cárneos crus e alimentos prontos para o consumo, principalmente por contaminação cruzada e

ausência de tratamentos térmicos adicionais. A ingestão de alimentos contaminados com o patógeno pode determinar o desenvolvimento da listeriose, dependendo do potencial patogênico das cepas presentes e o status imunológico do consumidor. A doença é caracterizada por três síndromes: gastroenterite febril; listeriose materno-fetal/neonatal ou bacteremia com ou sem acometimento do sistema nervoso central. Outras infecções menos comuns também já foram descritas, como endocardites, miocardites, arterites, pneumonias, pleurites, hepatites, peritonites e abscessos localizados, dentre outros (Vázquez-Boland et al., 2001). A listeriose na forma invasiva é caracterizada como uma doença severa e acomete principalmente pessoas pertencentes a grupos de risco como mulheres grávidas, neonatos, indivíduos imunocomprometidos e idosos (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007).

Os casos de gastroenterites geralmente ocorrem em indivíduos saudáveis e o período médio de incubação é de 24 horas. Nestes casos os sintomas são diarreia, febre, dor abdominal, dor de cabeça e mialgias, entretanto a maioria dos pacientes recupera-se sem a necessidade de tratamento com antibióticos. Em gestantes, a infecção geralmente apresenta sintomas de gripe, ocorrendo febre e dor de cabeça e as complicações mais comuns são o aborto espontâneo ou natimorto. Já em recém-nascidos existem duas formas de listeriose: a precoce e a tardia. A precoce está associada a problemas no sistema respiratório e bacteremia, enquanto que a tardia ocorre normalmente após duas semanas de vida e está associada à meningite. A listeriose é reconhecida como uma das principais causas de meningite em recém-nascidos (Lamont et al., 2011; Slutsker and Schuchat, 1999; Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Em adultos, *L. monocytogenes* apresenta tropismo pelo sistema nervoso central, causando meningite, meningoencefalite, romboencefalite, abscessos no cérebro e a maioria das infecções ocorre em pacientes com mais de 50 anos de idade (Disson and Lecuit, 2012).

A incidência de listeriose é baixa, mas representa um importante problema de saúde pública, devido a sua alta taxa de mortalidade e custos associados com o tratamento. A doença tem sido mais frequentemente observada em países desenvolvidos, devido ao hábito de consumo de alimentos prontos para consumo, mas também por terem um sistema de notificação mais organizado e eficiente. Nos EUA, onde há uma rede eficiente de monitoramento de enfermidades associadas a consumo de alimentos, estima-se que ocorram em média 2500 casos anuais de listeriose de origem alimentar, com aproximadamente 500 mortes. Esses dados estatísticos determinam que *L. monocytogenes* seja um dos patógenos que mais causa mortes nos EUA, sendo responsável por 27,6% do total de óbitos causados por doenças de origem alimentar (Mead et al., 1999). Na Europa, em 2009, foram notificados 1645 casos de listeriose, 19% a mais que em 2008 (Lahuerta et al., 2011). No Brasil poucos casos da doença são conhecidos e não estão associados ao consumo de alimentos (Hofer et al., 1999; Hofer et al., 1998; Vasconcelos et al., 2008).

3. Contaminação em carne bovina

A presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em carne bovina ocorre pela facilidade de contaminação durante o processamento. É sabido que as espécies do gênero estão naturalmente presentes no ambiente industrial. Além disso, o trato intestinal dos animais funciona como uma importante fonte de contaminação de carcaças e do ambiente (Zhu et al., 2012).

Em um estudo realizado na Polônia recentemente, 406 amostras de couro e as respectivas 406 carcaças bovinas foram testadas para a presença de *Listeria* spp. Foi verificado que 44/406 amostras de couro estavam contaminadas por *L. monocytogenes* e em apenas 10/406 carcaças foi detectada a presença do patógeno (Wieczorek et al.,

2012). Vanderlinde et al. (1998) observaram baixa frequência de *L. monocytogenes* em carcaças bovinas após a ducha final em um frigorífico habilitado para exportação localizado na Austrália, e nos EUA Rivera-Betancourt et al. (2004) identificaram baixa frequência de *L. monocytogenes* (apenas antes da evisceração). Em outro estudo realizado nos EUA, Guerini et al. (2007) encontraram uma variada frequência de *L. monocytogenes* em carcaças antes e após a evisceração em diferentes estações do ano, mas em apenas uma das quatro plantas de processamento estudadas *L. monocytogenes* foi isolada de carcaças após a ducha final. Madden et al. (2001) não detectaram *L. monocytogenes* em carcaças bovinas analisadas na Irlanda, sendo que apenas 6 das 200 carcaças testadas estavam contaminadas com *L. innocua* (5) e *L. seeligeri* (1).

Na China, Zhu et al. (2012) conduziram um estudo entre 2009 e 2010 e detectaram *L. monocytogenes* em fezes de bovinos, couros, carcaças (antes e após a evisceração e após ducha final), amostras ambientais e de carne bovina. Em uma das plantas de processamento incluídas no estudo, todas as amostras de carne bovina estavam contaminadas com o patógeno. Outro estudo realizado na China entre 2008 e 2009 mostrou que *L. monocytogenes* estava presente em 11 de 107 amostras de carne bovina analisadas; no mesmo estudo os autores ainda demonstraram que o patógeno estava presente em uma variedade de outros produtos cárneos (Wang et al., 2013). Em estudo conduzido por da Rocha et al. (2012), realizado nos EUA, foi observada a presença de *L. monocytogenes* em 18 das 133 amostras de carne bovina analisadas.

A presença de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em carcaças bovinas e ambientes industriais também já foi evidenciada em outros países (Korsak et al., 1998; Peccio et al., 2003). Segundo Bunčić (1991), *L. monocytogenes* estava presente em 19% das fezes de gado abatido na Iugoslávia; neste mesmo trabalho, a incidência de *L. monocytogenes* em carne moída foi de 69%. No Brasil, Mantilla et al. (2007) verificaram que 6,7% das amostras de carne moída testadas estavam contaminadas pelo patógeno e Barros et al.

(2007) evidenciaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em instalações e equipamentos de uma planta de processamento e em cortes de carne bovina. Estes estudos demonstram que *L. monocytogenes* está presente no ambiente industrial e pode chegar aos produtos finais através da contaminação cruzada.

Referências Bibliográficas

- Barnes, R., Archer, P., Strack, J., Istre, G. 1989. Listeriosis associated with consumption of turkey franks. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 38, 267-268.
- Barros, M.A., Nero, L.A., Silva, L.C., d'Ovidio, L., Monteiro, F.A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E., Beloti, V. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science* 76, 591-596.
- Beresford, M., Andrew, P., Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *Journal of Applied Microbiology* 90, 1000-1005.
- Brosch, R., Chen, J., Luchansky, J.B. 1994. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2584-2592.
- Bunčić, S. 1991. The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia. *International Journal of Food Microbiology* 12, 173-180.
- Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145, 1-8.
- Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2008. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiology* 16, 388-396.
- Chmielewski, R., Frank, J. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2, 22-32.
- Cole, M., Jones, M., Holyoak, C. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 69, 63-72.

- da Rocha, L.S., Gunathilaka, G.U., Zhang, Y. 2012. Antimicrobial-Resistant *Listeria* Species from Retail Meat in Metro Detroit. *Journal of Food Protection* 75, 2136-2141.
- de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vázquez-Boland, J.A. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* 14, 118-127.
- Destro, M.T. 2000. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *International Journal of Food Microbiology* 62, 191-196.
- Disson, O., Lecuit, M. 2012. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence* 3, 213-221.
- Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity* 72, 1072-1083.
- Dykes, G., Moorhead, S. 2000. Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology* 56, 161-166.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V., Reingold, A.L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine* 312, 404-407.
- Galvão, N.N., Chiarini, E., Destro, M.T., Ferreira, M.A., Nero, L.A. 2012. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science* 92, 635-643.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113, 1-15.
- Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., Den Bakker, H.C. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1280-1288.
- Graves, L.M., Swaminathan, B., Reeves, M.W., Hunter, S.B., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Schuchat, A. 1994. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 32, 2936-2943.

- Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M., Allerberger, F. 2003. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 22, 16-20.
- Guerini, M.N., Brichta-Harhay, D.M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Bosilevac, J.M., Kalchayanand, N., Wheeler, T.L., Koohmaraie, M. 2007. *Listeria* prevalence and *Listeria monocytogenes* serovar diversity at cull cow and bull processing plants in the United States. *Journal of Food Protection* 70, 2578-2582.
- Halter, E.L., Neuhaus, K., Scherer, S. 2013. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 641-647.
- Hofer, C.B., Melles, C.E.A., Hofer, E. 1999. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 41, 375-377.
- Hofer, E., do Nascimento, R., de Oliveira, M. 1998. *Listeria monocytogenes* meningitis. Case reports in patients from the Federal District]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 31, 173.
- Ireton, K., Cossart, P. 1997. Mécanismes d'entrée de *Listeria monocytogenes* dans les cellules de mammifères: facteurs bactériens, ligands cellulaires, signalisation, *Annales de l'Institut Pasteur/Actualites*, vol. 8. Elsevier. 131-138.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. *Modern Food Microbiology* Springer.
- Jefferson, K.K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters* 236, 163-173.
- Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., Pappelbaum, K. 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology* 158, 203-208.
- Korsak, N., Daube, G., Ghafir, Y., Chahed, A., Jolly, S., Vindevogel, H. 1998. An efficient sampling technique used to detect four foodborne pathogens on pork and beef carcasses in nine Belgian abattoirs. *Journal of Food Protection* 61, 535-541.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölsama, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24-29.
- Lahuerta, A., Westrell, T., Takkinen, J., Boelaert, F., Rizzi, V., Helwigh, B., Borck Høg, B., Korsgaard, H., Ammon, A., Mäkelä, P. 2011. Zoonoses in the European

- Union: origin, distribution and dynamics: the EFSA-ECDC summary report 2009. *Eurosurveillance* (Online Edition) 16, 5-8.
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N., Romero, R. 2011. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *Journal of Perinatal Medicine* 39, 227-236.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P.A., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S.M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 2210-2214.
- Lee Wong, A.C. 1998. Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science* 81, 2765-2770.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver, R. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319, 823.
- Madden, R.H., Espie, W.E., Moran, L., McBride, J., Scates, P. 2001. Occurrence of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. *Meat Science* 58, 343-346.
- Mantilla, S.P.S., Franco, R.M., Oliveira, L.A.T., Santos, É.B., Gouvêa, R. 2007. Occurrence of *Listeria* spp. in bovine ground meat samples commercialized in Niterói, RJ, Brazil. *Ciência e Agrotecnologia* 31, 1225-1230.
- Mascola, L., Sorvillo, F., Goulet, V., Hall, B., Weaver, R., Linnan, M. 1992. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*-observations during a community-wide, common-source outbreak. *Clinical Infectious Diseases* 15, 557-558.
- McKellar, R. 1994. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 4219.
- McLauchlin, J., Hall, S., Velani, S., Gilbert, R. 1991. Human listeriosis and paté: a possible association. *BMJ: British Medical Journal* 303, 773.
- Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607.
- Miyasaki, K.N., Chiarini, E., Destro, M.T., Landgraf, M., Franco, B.D.G.d.M. 2009. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguiça, a Brazilian fresh pork sausage. *Meat Science* 83, 523-527.
- Møretrø, T., Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107-121.

- Okada, Y., Okutani, A., Suzuki, H., Asakura, H., Monden, S., Nakama, A., Maruyama, T., Igimi, S. 2011. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. *The Journal of Veterinary Medical Science the Japanese Society of Veterinary Science* 73, 16-81.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C.d., Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79-96.
- Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., Rosmini, R., Trevisani, M. 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat producing plants. *Letters in Applied Microbiology* 37, 234-238.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., Brisse, S. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens* 4.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Westmoreland, K.E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J.O., Koohmaraie, M. 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection* 67, 295-302.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. 2007. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 1.
- Rocourt, J., Jacquet, C., Reilly, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 62, 197-209.
- Ryser, E.T., Marth, E.H. 2007. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety *CRC Press*.
- Sant'Ana, A.S., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco, B. 2012. 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* 155, 1.
- Sauders, B.D., Overdeest, J., Fortes, E., Windham, K., Schukken, Y., Lembo, A., Wiedmann, M. 2012. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 4420-4433.
- Schlech III, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H. 1983. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308, 203-205.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C.V. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4, 169-183.

- Seeliger, H., Jones, D. 1986. Genus *Listeria*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2, 1235-1245.
- Slutsker, L., Schuchat, A. 1999. Listeriosis in humans. *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL DEKKER-*, 75-96.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243.
- Vanderlinde, P.B., Shay, B., Murray, J. 1998. Microbiological quality of Australian beef carcass meat and frozen bulk packed beef. *Journal of Food Protection* 61, 437-443.
- Vasconcelos, R.M., Almeida, A.E.C.C., Hofer, E., Silva, N.M.M., Marin, V.A. 2008. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 836-838.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584-640.
- Wang, X.-M., Lü, X.-F., Yin, L., Liu, H.-F., Zhang, W.-J., Si, W., Yu, S.-Y., Shao, M.-L., Liu, S.-G. 2013. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control* 32, 153-158.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P. 2008. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7629-7642.
- Ward, T.J., Gorski, L., Borucki, M.K., Mandrell, R.E., Hutchins, J., Pupedis, K. 2004. Intraspecific Phylogeny and Lineage Group Identification Based on the *prfA* Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes*†. *Journal of Bacteriology* 186, 4994-5002.
- Wieczorek, K., Dmowska, K., Osek, J. 2012. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from bovine hides and carcasses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2043-2045.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L., Batt, C.A. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity* 65, 2707-2716.
- Williams, S.K., Roof, S., Boyle, E.A., Burson, D., Thippareddi, H., Geornaras, I., Sofos, J.N., Wiedmann, M., Nightingale, K. 2011. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. *Journal of Food Protection* 74, 63-77.

Zhu, L., Feng, X., Zhang, L., Zhu, R., Luo, X. 2012. Prevalence and Serotypes of *Listeria monocytogenes* Contamination in Chinese Beef Processing Plants. Foodborne Pathogens and Disease 9, 556-560.

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* em uma planta de processamento de carne bovina e cortes cárneos e caracterizar os isolados obtidos por técnicas fenotípicas e moleculares.

Objetivos específicos

- ✓ Verificar a ocorrência de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* de uma planta de processamento de carne bovina e cortes cárneos;
- ✓ Realizar a sorotipagem molecular dos isolados de *L. monocytogenes*;
- ✓ Sequenciar os produtos atípicos obtidos pela sorologia molecular;
- ✓ Determinar os perfis genéticos por eletroforese em gel em campo pulsado e avaliar a diversidade genética entre os isolados de *L. monocytogenes*;
- ✓ Detectar a presença dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA* e *iap* nos isolados;
- ✓ Caracterizar o perfil de resistência dos isolados a antimicrobianos.

CAPÍTULO 01. Serotype diversity of *Listeria monocytogenes* in a beef processing facility: identification of a novel serotype variant

Artigo a ser submetido ao *International Journal of Food Microbiology*

Title page

Serotype diversity of *Listeria monocytogenes* in a beef processing facility: identification of a novel serotype variant

Running title: novel serotype variant *L. monocytogenes*

Anderson Carlos Camargo, Mariane Rezende Dias, Marcus Vinícius Coutinho Cossi, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga Lanna, Paulo Sérgio de Arruda Pinto, Luís Augusto Nero*

Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570 000, Viçosa, MG, Brazil

* Corresponding author: Tel.: + 55 31 3899 1463; fax: + 55 31 3899 1457. E-mail address: nero@ufv.br (L.A. Nero)

Abstract

Beef processing environment is considered a relevant source of pathogenic strains of *Listeria monocytogenes*, demanding tracking studies to identify their specific origins and control by food industries. This study aimed to identify the pathogenic serotypes of *L. monocytogenes* in a beef processing facility. Surface samples of beef processing steps (knives, tables, hands of the employees, and beef cuts) were collected and subjected to *Listeria* spp. detection according to ISO 11.290-1 and ISO 11.290-2. Suspected *Listeria* isolates were identified by biochemical tests and serotyped by multiplex PCR. PCR products from atypical serotype groups were sequenced. *Listeria* spp. was identified in all processing steps (61/272), with *L. monocytogenes* being detected in 23 samples. A total of 96 isolates was identified as *L. monocytogenes*, mainly from the 1/2c or 3c serogroup (74 isolates), and 1/2b, 3b or 7 serogroup (7 isolates). Six isolates were identified as the VIIb-v1 serotype, an atypical serotype described previously as a 4b variant. Nine isolates were characterised as a novel variant due to the amplification of the five target genes researched in the serotyping multiplex PCR. Considering that this pattern of variants is typically from 4b isolates, the *lmo0737* and *lmo1118* PCR products of the atypical isolates were sequenced and presented 99 to 100% homology when compared to sequences previously deposited in GenBank. The obtained data, thus, confirmed the beef processing environment as a potential source of pathogenic strains of *L. monocytogenes* and described a novel variant serotype of this foodborne pathogen.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, beef, serotyping, atypical variants

1. Introduction

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis, a severe foodborne disease that affects mainly children, the elderly, immunocompromised patients, and pregnant women. Listeriosis is characterised by gastroenteritis and septicaemia, leading to abortion and infections in the nervous system. Its mortality rates vary from 20 to 30%, this being common mainly when the pathogen is able to cause encephalitis and meningitis (Behravesh et al., 2011; Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007).

Due to the ubiquitous nature and adhesion ability of *L. monocytogenes*, the food industry environment is considered an important source of contamination with this foodborne pathogen (Carpentier and Cerf, 2011; Møretrø and Langsrud, 2004). Based on these characteristics, food industries have adopted control strategies to identify contaminated utensils and equipment, as well as cleaning procedures to eliminate *L. monocytogenes*. The beef processing environment is usually associated with this foodborne pathogen, highlighting the relevance of beef products in the transmission of *L. monocytogenes* to humans (Barros et al., 2007; Peccio et al., 2003; Rocha et al., 2012).

The association between food and clinical *L. monocytogenes* strains is usually made by serotyping. To date, 13 serotypes have been described, but only the serotypes 1/2a, 1/2b, and 4b have been reported to be responsible for 95% of listeriosis cases. Serotype 4b is responsible for the majority of outbreaks and severe infections (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Hence, the serological identification of *L. monocytogenes* is an important indicator of the virulence potential of the strains, with the multiplex PCR described by Doumith et al. (2004) being internationally used for this purpose. This protocol allows the differentiation among the main *L. monocytogenes* serotypes associated with cases and outbreaks (Doumith et al., 2005).

This multiplex PCR protocol targets the identification of five specific DNA regions: *prs* (typical of the *Listeria* genus), *lmo0737*, *lmo1118*, *ORF2819*, and *ORF2110*. Considering the combinations of positive results, *L. monocytogenes* isolates can be identified as belonging to different lineages, with some variations being noted between different studies (Orsi et al., 2011). Recent studies identified *L. monocytogenes* 4b strains that presented atypical patterns of positive results in the Doumith multiplex PCR. Despite presenting positive results for *prs*, *ORF2819*, and *ORF2110*, these strains also gave positive results for *lmo0737* (Huang et al., 2011; Leclercq et al., 2011; Lee et al., 2012). Atypical strains have been identified from food and clinical samples, demonstrating their relevance as a pathogenic agent of listeriosis and the involvement of food in this transmission chain (Lee et al., 2012).

The present study aimed to identify *L. monocytogenes* in beef cuts and in the beef processing environment from a slaughterhouse facility, analysing the serological diversity of the obtained isolates.

2. Material and Methods

2.1. Sampling

A slaughterhouse located in the Minas Gerais state, Brazil, was selected for the present study. This establishment processes beef from the point of slaughter to the procurement of end cuts, and was visited 13 times for sampling during the experiment. In each visit, surface samples with an area of 400 cm² from knives (n = 26), tables (n = 78), and the hands of employees (n = 74) were collected before and during beef processing. In addition, surface samples of 400 cm² from the beef cuts rump (n = 32), tenderloin (n = 30), and shoulder (n = 32) were also collected. Samples from each point were collected by swabbing four limited areas (sterile plastic templates of 100 cm²) with

sterile sponges (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), previously moistened with 10 mL of buffered peptone water solution (at 0.1%, w/v, BPW, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) and kept at 4°C until analysis.

In aseptic conditions, each set of four swabs from each sample was added to 160 mL of BPW (Oxoid) and homogenised, with 40-mL aliquots (representing 80 cm² of each sample) subjected to microbiological analysis to detect *Listeria* spp.

2.2. *Listeria* spp. detection

Protocols ISO 11.290-1 and ISO 11.290-2 (ISO, 1996; ISO, 2004), with modifications, were adopted in this step of the study. Forty-millilitre aliquots of the samples were centrifuged at 4°C for 15 min (1,000 × *g*), the supernatant then being discarded and the pellet suspended with 10 mL of half-Fraser broth (Oxoid), followed by incubation at 30°C for 24 h. Then, 0.1-mL aliquots were transferred to Fraser broth (Oxoid) and incubated at 37°C for 24 and 48 h. The obtained cultures were streaked on Chromogenic *Listeria* agar (Oxoid) and Oxford agar (Oxoid), both incubated at 37°C for 24 and 48 h. Suspected *Listeria* spp. colonies were streaked and purified onto trypticase soy agar (Oxoid), before incubation at 30°C for 24 h.

Distinct and isolated colonies per sample were selected and subjected to biochemical identification according to the characteristics described by Pagotto et al. (2006): catalase production, motility at 25°C, haemolysis in defibrinated horse blood agar (7% v/v), and a fermentation pattern of dextrose, rhamnose, mannitol, and xylose.

2.3. Serology and sequencing

Isolates identified as *Listeria* spp. by biochemical tests were subjected to serological identification by multiplex PCR. Isolated colonies were transferred to trypticase soy broth (Oxoid), incubated at 30°C for 24 h, and the obtained cultures

subjected to DNA extraction and purification using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Corp., Madison, WI, USA). The obtained DNA was subjected to multiplex PCR, according to the method of Doumith et al. (2004), with modifications: 25- μ L reactions were composed of 12.5 μ L of GoTaq Green Master Mix (Promega), 2.0 μ L of DNA, 8.4 μ L of the five pairs of primers (1 pmol), and 2.1 μ L of ultra pure PCR water (Promega). PCR conditions were: 94°C for 3 min; 35 cycles of 94°C for 0.4 min, 53°C for 1.15 min, 72°C for 1.15 min; and 72°C for 7 min. Five-microlitre aliquots of the PCR products were electrophoresed on 2.0 % (w/v) agarose gels in 0.5 \times Tris/Borate/EDTA buffer, stained with GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), and visualised by a transilluminator. For each target DNA region, the following PCR product sizes were observed: 370 bp for *prs*, 471 bp for *ORF2819*, 597 bp for *ORF2110*, 691 bp for *lmo0737*, and 906 bp for *lmo1118*.

L. monocytogenes 4b isolates that presented atypical results (positive for *lmo0737* and/or *lmo1118*) were subjected to simplex PCR reactions using *lmo0737* or *lmo1118* related primers and the same PCR conditions described above. PCR products were subjected to sequencing by Macrogen Inc. (Seoul, Korea), and the obtained sequences were analysed using the software Basic Alignment Search Tool (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) and compared to similar sequences from the database available at the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

3. Results and Discussion

L. monocytogenes, *L. innocua*, and *L. seeligeri* were detected in the tested samples, and their frequencies are presented in Table 1. The occurrence of *Listeria* spp. in beef products is usually a consequence of contamination from the slaughtering

environment, from the point of carcass handling, to the production steps of the end products, where cross-contamination can occur between utensils and equipment (Fenlon et al., 1996; Skovgaard and Nørrung, 1989; Yücel et al., 2005). This contamination route was evidenced by our data, since *Listeria* spp. (including *L. monocytogenes*) was detected in samples even before the beginning of beef processing, indicating the persistence of these microorganisms in the environment (Table 1) (Carpentier and Cerf, 2011; Galvão et al., 2012; Peccio et al., 2003). The presence of *L. monocytogenes* in beef cuts demonstrates the significance of the cross-contamination from utensils and the environment of beef processing (Table 1) (Ochiai et al., 2010; Rocha et al., 2012). Considering the 23 samples positive for *L. monocytogenes*, ten were also positive for *L. innocua* (Table 1), suggesting that *Listeria* spp. can be considered an indicator of the presence of pathogenic species (Barros et al., 2007; Thevenot et al., 2005; Williams et al., 2011).

A total of 231 isolates were identified by biochemical tests and multiplex PCR as being *Listeria* spp. (*prs* positive), with *L. innocua* (n = 129), *L. monocytogenes* (n = 96), and *L. seeligeri* (n = 6) being identified. Some isolates presented atypical biochemical results, but were identified as *L. monocytogenes* or *Listeria* spp. based on the results of the multiplex PCR: six isolates were identified as *L. innocua* based on the biochemical results, but as *L. monocytogenes* using the multiplex PCR, while two isolates were identified as *L. monocytogenes* by the biochemical tests (due to haemolysis), but as *Listeria* spp. by the multiplex PCR. *Listeria* spp. strains presenting atypical biochemical and morphological characteristics are often observed, requiring further molecular tests for their proper identification (Aragon-Alegro et al., 2008; Miyasaki et al., 2009; Moreno et al., 2012).

Table 2 shows the serological diversity of the 96 isolates identified as *L. monocytogenes*. The serogroup 1/2c or 3c prevailed, as observed by Ochiai et al. (2010)

in beef and pork processing environments. Serogroup 1/2b, 3b or 7 was also identified. The identification of *L. monocytogenes* strains belonging to this serogroup is relevant due to their pathogenic potential and association with cases and outbreaks of listeriosis (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Considering the serological classification proposed by Leclercq et al. (2011), six isolates from the same sample were identified as IVb-v1 serogroup, due to the positive results in the multiplex PCR for *prs*, *ORF2918*, *ORF2110*, and *lmo0737* (Figure 1). This atypical *L. monocytogenes* (IVb-v1) is considered a 4b variant and has already been isolated from food and clinical samples, highlighting their pathogenic potential (Huang et al., 2011; Leclercq et al., 2011; Vasconcelos et al., 2008). Lee et al. (2012) demonstrated that IVb-v1 *L. monocytogenes* strains presented a specific gene cassette (comprising the genes *lmo0734* to *lmo0739*), suggesting a horizontal transfer of plasmids from lineage II strains that usually present these gene cassettes. PCR products of *lmo0737* from the IVb-v1 isolates were sequenced and presented 99 to 100% homology with the same region obtained from the strains 10M130 (HQ221545.1), 10M138 (HQ221543.1), and 2007/01070 (HQ123583.1), thus confirming the obtained result.

Nine isolates from three samples presented a novel pattern of positivity for the genes investigated for serological identification, as proposed by Doumith et al. (2004) (Table 2). These isolates presented amplification products of all the target genes (Figure 1), which has not been described previously. *L. monocytogenes* IVb-v1 strains have been previously identified by phenotypic tests as serotype 4b (Huang et al., 2011; Leclercq et al., 2011), indicating that the observed atypical isolates can be considered novel variants of this serotype. Sequencing of the *lmo0737* and *lmo1118* PCR products confirmed the obtained results. As observed previously, *lmo0737* PCR products presented 99 to 100% homology with the same region from the strains 10M130 (HQ221545.1), 10M138 (HQ221543.1), and 2007/01070 (HQ123583.1), while *lmo1118*

presented 100% homology with the same region from the strains SLCC2479 (FR733649.1) and SLCC2372 (FR733648.1). These data confirmed the obtained results for these atypical strains.

A diverse range of serotypes was observed in some tested samples: the hand of the employees before processing, as well as in those from the tenderloin and shoulder (Table 2). This observed diversity indicated that several sources of distinct *L. monocytogenes* serotypes contributed to the contamination of the end products (Kramarenko et al., 2013; Mendonça et al., 2012). Despite not being usually consumed without cooking, the presence of *L. monocytogenes* in beef cuts is relevant due to the possibility of cross-contamination during handling by consumers, thus highlighting its potential hazard (Gallagher et al., 2013; Kovačević et al., 2012).

In conclusion, a diverse range of *L. monocytogenes* serotypes were identified from different points of beef processing, including the serotypes 1/2b and 4b, which are usually associated with listeriosis cases and outbreaks. Serotypes IVb-v1 were also identified among the isolates, as well as a novel variant characterised by the presence of all five target genes used for serotyping, as proposed by Doumith et al. (2004).

lmo0737 and *lmo1118* sequences of the atypical *L. monocytogenes* isolates have been deposited in GenBank with accession numbers KF015602 - KF015608.

Acknowledgments

The authors are thankful to CNPq, CAPES, and FAPEMIG.

References

Aragon-Alegro, L.C., Aragon, D.C., Martinez, E.Z., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T. 2008. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. Food Control 19, 483-486.

- Barros, M.A., Nero, L.A., Silva, L.C., d'Ovidio, L., Monteiro, F.A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E., Beloti, V. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science* 76, 591-596.
- Behravesh, C.B., Jones, T.F., Vugia, D.J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K.E., Henao, O.L. 2011. Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 1996–2005. *Journal of Infectious Diseases* 204, 263-267.
- Carpentier, B., Cerf, O. 2011. Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145, 1-8.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3819-3822.
- Doumith, M., Jacquet, C., Gerner-Smidt, P., Graves, L.M., Loncarevic, S., Mathisen, T., Morvan, A., Salcedo, C., Torpdahl, M., Vazquez, J.A., Martin, P. 2005. Multicenter Validation of a Multiplex PCR Assay for Differentiating the Major *Listeria monocytogenes* Serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an International Standard. *Journal of Food Protection* 68, 2648-2650.
- Fenlon, D.R., Wilson, J., Donachie, W. 1996. The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. *Journal of Applied Microbiology* 81, 641-650.
- Gallagher, D., Ebel, E.D., Gallagher, O., LaBarre, D., Williams, M.S., Golden, N.J., Pouillot, R., Dearfield, K.L., Kause, J. 2013. Characterizing uncertainty when evaluating risk management metrics: Risk assessment modeling of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat deli meats. *International Journal of Food Microbiology* 162, 266-275.
- Galvão, N.N., Chiarini, E., Destro, M.T., de Aguiar Ferreira, M., Nero, L.A. 2012. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science* 92, 635-643.
- Huang, B., Fang, N., Dimovski, K., Wang, X., Hogg, G., Bates, J. 2011. Observation of a new pattern in serogroup-related PCR typing of *Listeria monocytogenes* 4b isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 426-429.

- ISO. 1996. ISO 11290-1 - Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* -- Part 1: Detection method, vol. 11290-1. ISO, Geneva.
- ISO. 2004. ISO 11290-1/Amd 1 - Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data, vol. ISO 11290-1/Amd 1. ISO, Geneva.
- Kovačević, J., Mesak, L.R., Allen, K.J. 2012. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology* 30, 372-378.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Põltsama, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24-29.
- Leclercq, A., Chenal-Francisque, V., Dieye, H., Cantinelli, T., Drali, R., Brisse, S., Lecuit, M. 2011. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. *International Journal of Food Microbiology* 147, 74-77.
- Lee, S., Ward, T.J., Graves, L.M., Wolf, L.A., Sperry, K., Siletzky, R.M., Kathariou, S. 2012. Atypical *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains harboring a lineage II-specific gene cassette. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 660-667.
- Mendonça, K.S., Michael, G.B., von Laer, A.E., Menezes, D.B., Cardoso, M.R.I., Silva, W.P. 2012. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Control* 28, 171-177.
- Miyasaki, K.N., Chiarini, E., Sant'Ana, A.S., Destro, M.T., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M. 2009. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguiça, a Brazilian fresh pork sausage. *Meat Science* 83, 523-527.
- Moreno, L.Z., Paixão, R., Gobbi, D.D., Raimundo, D.C., Ferreira, T.P., Hofer, E., Matte, M.H., Moreno, A.M. 2012. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. *Research in Microbiology* 163, 268-271.
- Møretrø, T., Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107-121.
- Ochiai, Y., Yamada, F., Batmunkh, O., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., Ueda, F. 2010. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. *Journal of Food Protection* 73, 1688-1693.

- Orsi, R.H., Bakker, H.C.d., Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79-96.
- Pagotto, F., Corneau, N., Farber, J. 2006. *Listeria monocytogenes* infections. In: Riemann, H., Cliver, D., (Eds.), *Food-borne Infections and Intoxications*, 3rd ed. Academic Press, New York. 313-340.
- Peccio, A., Autio, T., Korkeala, H., Rosmini, R., Trevisani, M. 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. *Letters in Applied Microbiology* 37, 234-238.
- Rocha, L.S., Gunathilaka, G.U., Zhang, Y. 2012. Antimicrobial-resistant *Listeria* species from retail meat in Metro Detroit. *Journal of Food Protection* 75, 2136-2141.
- Skovgaard, N., Nørrung, B. 1989. The incidence of *Listeria* spp. in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. *International Journal of Food Microbiology* 8, 59-63.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243.
- Thevenot, D., Delignette-Muller, M.L., Christieans, S., Vernozy-Rozand, C. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *International Journal of Food Microbiology* 102, 85-94.
- Vasconcelos, R.M., Almeida, A.E.C.C., Hofer, E., Silva, N.M.M., Marin, V.A. 2008. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 836-838.
- Williams, S.K., Roof, S., Boyle, E.A., Burson, D., Thippareddi, H., Geornaras, I., Sofos, J.N., Wiedmann, M., Nightingale, K. 2011. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in small and very small ready-to-eat meat processing plants. *Journal of Food Protection* 74, 63-77.
- Yücel, N., Çıtak, S., Önder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology* 22, 241-245.

Table 1. Frequencies of positive results for *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. seeligeri* from surface samples of beef cuts and an beef processing environment from a slaughtering located in Minas Gerais State, Brazil.

samples	step	n	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)	<i>L. innocua</i> (%)	<i>L. seeligeri</i> (%)
knife	before processing	13	2 (15.4)	1 (7.7)	2 (15.4)	-
	during processing	13	2 (15.4)	-	2 (15.4)	-
table	before processing	39	2 (5.1)	1 (2.6)	1 (2.6)	-
	during processing	39	13 (33.3)	2 (5.1)	10 (25.6)	1 (2.6)
hand of employees	before processing	37	7 (18.9)	4 (10.8)	5 (13.5)	-
	during processing	37	9 (24.3)	3 (8.1)	7 (18.9)	-
cuts	rump	32	9 (28.1)	4 (12.5)	8 (25)	-
	tenderloin	30	2 (6.7)	1 (3.3)	1 (3.3)	-
	shoulder	32	15 (46.9)	7 (21.9)	11 (34.4)	-
total	-	272	61 (22.4)	23 (8.5)	46 (16.9)	1 (0.37)

Table 2. Numbers of obtained *Listeria monocytogenes* isolates from environmental samples (frequencies of positive results) from a beef processing facility located in Minas Gerais State, Brazil, and their serotype diversity characterized by multiplex PCR, according Doumith et al. (2004).

samples	step	n	Serotype group*			
			1/2c or 3c	1/2b, 3b or 7	IVb-v1	novel group
knife	before processing	1 (1)	1 (1)	-	-	-
	during processing	-	-	-	-	-
table	before processing	3 (1)	3 (1)	-	-	-
	during processing	9 (2)	9 (2)	-	-	-
hand of employees	before processing	14 (4)	9 (4)	-	-	5 (1)
	during processing	8 (3)	8 (3)	-	-	-
cuts	rump	13 (4)	7 (3)	-	6 (1)	-
	tenderloin	14 (1)	12 (1)	-	-	2 (1)
	shoulder	34 (7)	25 (6)	7 (1)	-	2 (1)
total	-	96 (23)	74 (21)	7 (1)	6 (1)	9 (3)

* Serotype group 1/2c or 3c: amplification of PCR products for *prs*, *lmo0737*, and *lmo1118*; 1/2b, 3b or 7: *prs*, *ORF2819*; 4b, 4d or 4e: *prs*, *ORF2819*, and *ORF 2110*; IVb-v1: *prs*, *ORF2819*, *ORF2110*, and *lmo0737*; novel group: *prs*, *ORF2819*, *ORF2110*, *lmo0737*, and *lmo1118*.

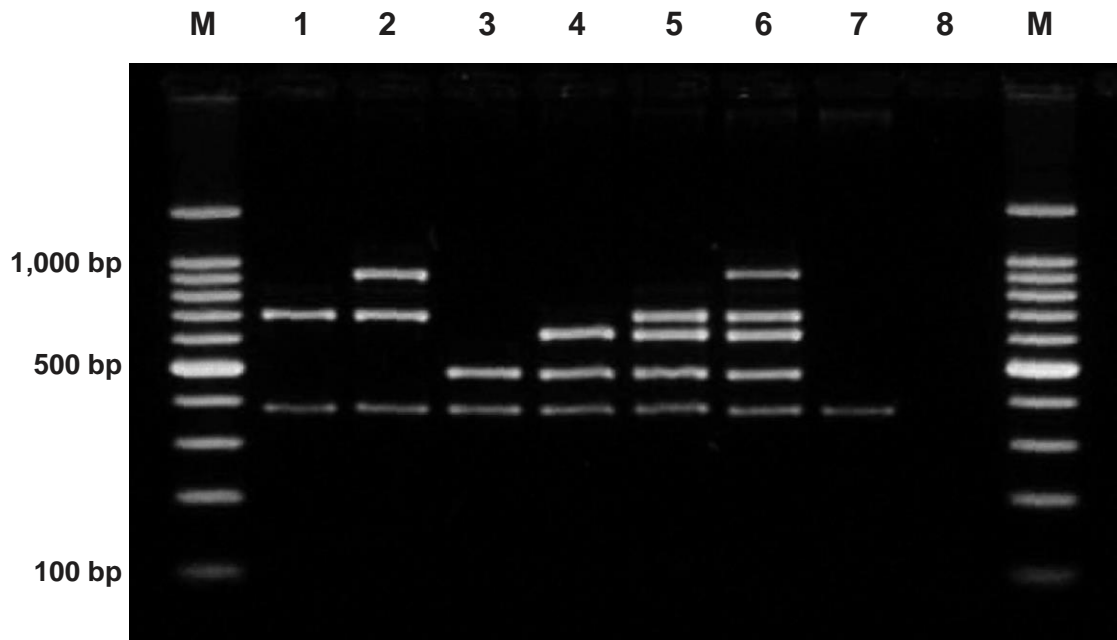


Figure 1. Multiplex PCR profiles for serotyping of *Listeria* spp. strains included in the present study, demonstrating the distinct combination of amplification products for *prs* (370 bp), *ORF2819* (471 bp), *ORF2110* (597 bp), *lmo0737* (691 bp), and *lmo1118* (906 bp). M: 100 bp DNA ladder (Promega Corp., Madison, WI, USA), line 1: *L. monocytogenes* 1/2a, line 2: *L. monocytogenes* 1/2c, line 3: *L. monocytogenes* 1/2b, line 4: *L. monocytogenes* 4b, line 5: *L. monocytogenes* IVb-v1, line 6: *L. monocytogenes* novel serotype variant, line 7: *Listeria innocua* (*Listeria* spp. control), line 8: negative control of PCR.

CAPÍTULO 02. Caracterização dos perfis genéticos e resistência a antimicrobianos de

Listeria monocytogenes obtidos de um ambiente de processamento de carne bovina

Artigo a ser traduzido e submetido ao *International Journal of Food Microbiology*

Página título

Caracterização dos perfis genéticos e resistência a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* obtidos de um ambiente de processamento de carne bovina

Running title: Diversidade e resistência de *L. monocytogenes*

Anderson Carlos Camargo, Mariane Rezende Dias, Marcus Vinícius Coutinho Cossi, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga Lanna, Valéria Quintana Cavicchioli, Paulo Sérgio de Arruda Pinto, Luís Augusto Nero*

Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570 000, Viçosa, MG, Brazil

* Corresponding author: Tel.: + 55 31 3899 1463; fax: + 55 31 3899 1457. E-mail address: nero@ufv.br (L.A. Nero)

Resumo

Noventa e seis isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos entre 2009 e 2012 de uma planta de processamento de carne bovina e cortes cárneos foram analisados neste estudo. Este número inclui um isolado de faca, 12 isolados de mesas, 22 isolados de mãos de manipuladores e 61 isolados de cortes de carne (alcatra, n=13; filé mignon, n=14; e paleta, n=34). Todos os isolados foram submetidos à eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) e PCR para a detecção de genes de virulência. Adicionalmente foi avaliado o perfil de resistência a antimicrobianos (n=15) utilizando fitas Etest® e M.I.C.Evaluators™. PFGE classificou os 96 isolados em 6 grupos subdivididos em 20 pulsotipos através da combinação dos padrões de restrição das enzimas *ApaI* e *AscI*. Diferentes sorotipos compartilharam mesmos grupos genéticos, mas não o mesmo pulsotipo. Ainda foi verificado que isolados recuperados de diferentes origens apresentaram mesmo perfil genético, e alguns isolados obtidos em diferentes visitas também foram agrupados no mesmo pulsotipo. Os genes de virulência pesquisados (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hlyA*, *actA*, e *iap*) foram detectados em todos os isolados. De maneira geral, os 20 isolados testados (um representante de cada pulsotipo) apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos, entretanto 19 isolados foram resistentes a sulfametoxazole e dois também foram resistentes a trimetropim. Outros dois isolados apresentaram múltipla resistência (gentamicina, trobamicina, clindamicina, trimetropim, e sulfametoxazole) e oito mostraram resistência intermediária a eritromicina. Os dados obtidos indicam a persistência de cepas de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de carne bovina, possíveis rotas de contaminação, e a ocorrência de isolados multi-resistentes a antimicrobianos usualmente utilizados no tratamento de listeriose.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; PFGE; genes virulência; antimicrobianos.

1. Introdução

A listeriose é considerada uma doença emergente desde a década de 1980 e diversos casos e surtos têm sido associados ao consumo de alimentos contaminados por *Listeria monocytogenes*, seu agente etiológico (Lundén et al., 2004; Mead et al., 2006). Essa enfermidade pode ser caracterizada por infecções severas como meningite, septicemia em recém-nascidos, pacientes imunocomprometidos ou idosos e levar ao aborto (Vázquez-Boland et al., 2001). *L. monocytogenes* possui ainda comprovada capacidade de persistência ambiental devido formação de biofilmes em superfícies amorfas e multiplicação em temperaturas de refrigeração (Møretrø and Langsrud, 2004). Considerando esses aspectos, a contaminação cruzada pode ser apontada como a principal forma de transmissão de *L. monocytogenes* aos produtos finais.

As cepas de *L. monocytogenes* são classificadas em quatro linhagens evolutivas (I, II, III e IV), que usualmente são associadas ao seu nicho ecológico. A maioria dos isolados pertence às linhagens I e II, com destaque para os sorotipos 1/2b e 4b (linhagem I) e 1/2a (linhagem II), frequentemente associados a casos clínicos de listeriose (Orsi et al., 2011). As cepas das linhagens III e IV são raras, e a maioria dos isolados estudados até o momento foi obtida de casos clínicos de ruminantes e seres humanos (Orsi et al., 2011; Shen et al., 2013; Ward et al., 2008). A sorotipagem e a eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE) são técnicas que têm sido utilizadas com bastante sucesso para caracterização de *L. monocytogenes*, e tem permitido a identificação de isolados clínicos e de alimentos com perfis genéticos idênticos. Essa associação comprova o importante papel dos alimentos contaminados no ciclo epidemiológico de transmissão de *L. monocytogenes* (Fugett et al., 2007; Mead et al., 2006).

Várias proteínas estão associadas à atividade patogênica de *L. monocytogenes* em células hospedeiras, como as internalinas, listeriolisina, fosfolipases e actina. Os genes que codificam para estes fatores de virulência são expressos sob o controle do regulon PrfA, que é seletivamente ativado no processo de invasão celular (de las Heras et al., 2011). Além da subtipagem e caracterização da presença de genes de virulência, a caracterização do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos vem sendo recomendada pela Organização Mundial de Saúde para caracterização de isolados clínicos. *L. monocytogenes* é sensível à maioria dos antimicrobianos e alguns estudos sugerem que isolados de origem humana e ambiental apresentam baixa frequência de resistência (Korsak et al., 2012; Morvan et al., 2010; Vitas et al., 2007). Por outro lado, diversos estudos têm demonstrado aumento das taxas de resistência a antimicrobianos em isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos de origem animal e ambientes industriais (Conter et al., 2009; Lungu et al., 2011; Pesavento et al., 2010).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar uma coleção de culturas composta por isolados identificados como *L. monocytogenes* obtidos de uma planta de processamento de carne bovina considerando os seguintes aspectos: perfil molecular por PFGE, presença de genes de virulência, perfis de susceptibilidade de antimicrobianos, e verificar as relações genotípicas entre isolados de diferentes origens, a fim de determinar os principais grupos genéticos e a persistência destes grupos no ambiente estudado.

2. Material e Métodos

2.1. Isolados de *L. monocytogenes*

Uma coleção bacteriana composta por 96 isolados identificados como *L. monocytogenes* foi analisada no estudo (Camargo et al., *a ser submetido*). Todos os isolados foram obtidos em uma planta de processamento de carne bovina localizada no estado de Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 2009 a 2012. As origens desses isolados e suas classificações sorológicas, obtidas conforme Doumith et al. (2004), são apresentadas na Tabela 1. Os isolados foram identificados como L01 a L96, aleatoriamente, conforme as suas origens (Tabela 1). Todos os isolados foram mantidos em estoques de caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) suplementadas com glicerol a 20 % (v/v), e armazenadas a -20 °C. Para utilização, alíquotas das culturas eram estriadas em agar tripticase de soja (TSA, Oxoid), incubadas a 35 °C por 24 h, quando colônias isoladas eram transferidas para TSB, com incubação a 35 °C por 24 h.

2.2. Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE)

Todas as culturas obtidas foram submetidas à extração de DNA cromossomal de acordo com o protocolo recomendado pelo Center for Diseases Control and Prevention (PulseNet) para subtipagem de *L. monocytogenes* (Graves and Swaminathan, 2001) e a digestão enzimática foi feita utilizando as enzimas *AscI* e *ApaI* (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Os produtos da macrorrestrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose Seakem Gold 1% em tampão TE 0,5X), utilizando o equipamento CHEF-DR II (BioRad, Philadelphia, NY, EUA) com os seguintes parâmetros: gradiente de 6 V/cm; switch time inicial, 4s; switch time final, 40s; e tempo de corrida de 20 horas. Os géis obtidos foram corados em banhos com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e os padrões de digestão foram

visualizados por luz ultravioleta, e as imagens obtidas analisadas pelos software BioNumerics (version 6.6 Applied Maths, Gand Bélgica). *Salmonella* Braenderup (H9812) digerida com *Xba*I (Promega Corp., Madison, WI, EUA) foi utilizada como referência para normalização das imagens e uma de tolerância de 5% para posição das bandas foi aplicada.

2.3. Genes de Virulência

Todas as culturas obtidas foram submetidas à extração de DNA total utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Após extração, a qualidade e quantidade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese em agarose a 1 % (v/v), e coradas com GelRed (Biotium). DNA dos isolados foram submetidos a reações de PCR para a detecção dos genes de virulência envolvidos nos processos de invasão celular: *inlA* (F:ACG AGT TAA CGG GAC AAA TGC; R:CCC GAC AGT GGT GCT AGA TT), *inlB* (F:TGGGAGAGTAACCCAACCAC; R:GTTGACCTTCGATGGTTGCT), *inlC* (F:AAT TCC CAC AGG ACA CAA CC; R:CGG GAA TGC AAT TTT TCA CTA), *inlJ* (F:TGT AAC CCC GCT ATC ACA GTT; R:AGC GGC TTG GCA GTC TAA TA), *plcA* (F:CTG CTT GAG CGT TCA TGT CTC ATC CCC C; R:ATG GGT TTC ACT CTC CTT CTA C), *hlyA* (F:GCA GTT GCA AGC GCT TGG AGT GAA; R:GCA ACG TAT CCT CCA GAG TGA TCG), *actA* (F:CGC CGC GGA AAT TAA AAA AAG A; R:ACG AAG GAA CCG GGC TGC TAG), e *iap* (F:ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG; R:TGA CAG CGT GTG TAG TAG CA) (Furrer et al., 1991; Liu et al., 2007; Notermans et al., 1991; Paziak Domańska et al., 1999; Suárez et al., 2001).

Os protocolos utilizados para detecção desses genes de virulência foram os descritos por (Liu et al., 2007) e Rawool et al. (2007). Para investigação dos genes *inlA*, *inlC* e *inlJ*, do grupo das internalinas, foi utilizado um protocolo de PCR multiplex, e

para o gene *inlB* um protocolo de PCR convencional. Adicionalmente, os genes *hlyA*, *actA* e *iap* foram pesquisados por um protocolo de PCR multiplex, e o gene *plcA* foi pesquisado com um protocolo de PCR convencional. Em todas os protocolos, reações com volume final de 25 µL eram compostas por 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2.0 µL de DNA, 1.0 µL de cada primer na concentração de 10 pmol, e água ultrapura para PCR (Promega) até completar o volume final. *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle positivo para os genes investigados.

2.4. Resistência a antimicrobianos

Considerando os perfis genéticos obtidos por PFGE, 20 isolados foram selecionados, representando cada um dos pulsotipos identificados, e submetidos a testes fenotípicos de identificação do perfil de resistência a 15 diferentes antimicrobianos, utilizando-se fitas Etest® (bioMérieux, L'Etoile, França) (rifampicina, trimetoprim, tobramicina, kanamicina, minociclina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazole) e M.I.C.Evaluators™ (Oxoid) (clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, vancomicina, gentamicina, ampicilina). Alíquotas de 0.1 mL das culturas selecionadas foram transferidas para caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid), incubadas a 35 °C por 18 to 24 h, e diluídas em NaCl 0.85% até obtenção de uma turbidez semelhante à escala 0.5 de MacFarland. Com auxílio de swabs estéreis, alíquotas das culturas selecionadas e diluídas foram distribuídas de maneira uniforme na superfície de placas contendo ágar BHI (Oxoid), e após absorção completa da cultura, adicionadas de fitas Etest® (BioMérieux) ou M.I.C.Evaluators™ (Oxoid). As placas foram então incubadas a 35 °C, e as leituras realizadas após 18 e 24 h, identificando-se os valores de concentração mínima inibitória para cada substância antimicrobiana e cultura selecionada. Considerando os resultados obtidos, cada cultura foi classificada como

sensível, resistente, ou com resistência intermediária a cada um dos antimicrobianos testados, conforme orientações dos fabricantes.

3. Resultados e Discussão

Os resultados da subtipagem por PFGE dos isolados mostraram uma divisão em seis grupos (Figura 1). A grande maioria dos isolados (n = 64), foram agrupados no grupo 1, identificados como pertencentes ao sorotipo 1/2c ou 3c e compartilharam similaridade entre 92% a 100% em 10 pulsotipos (isolados com mais de 99% de similaridade foram considerados do mesmo pulsotipo). Estes isolados foram obtidos em nove visitas, e isolados com perfis genéticos idênticos foram obtidos de diferentes visitas. Esse resultado indica a persistência dessas cepas identificadas como *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de carne bovina. Isolados dos sorotipos 1/2a e 1/2c (linhagem II) são frequentemente obtidos de ambientes industriais e alimentos, e normalmente apresentam maior habilidade de persistência ambiental que os isolados da linhagem I (Gianfranceschi et al., 2009; Kramarenko et al., 2013). Considerando os isolados pertencentes a esse grupo, é possível identificar várias rotas de contaminação no ambiente de processamento de carne bovina do estabelecimento analisado: isolados com perfis genéticos idênticos foram obtidos de utensílios limpos e sujos (L02, L10), de diferentes cortes finais (L54, L79, L85), e entre utensílios e cortes finais (L19, L54, L79, L85 e L17, L50, L75). Essas informações reforçam a importância da contaminação cruzada na transmissão de *L. monocytogenes* num ambiente industrial, permitindo a contaminação de cortes cárneos finais destinados ao consumo humano (Barros et al., 2007).

O grupo 2 foi formado por isolados que apresentaram dois pulsotipos distintos, sendo um agrupando seis isolados pertencentes ao sorotipo 4b atípico, e outro composto

por sete isolados do sorotipo 1/2b, 3b ou 7 (Figura 1). A taxa de similaridade entre os dois pulsotipos foi de 94%, e todos os isolados desse grupo foram obtidos de cortes finais de carne bovina. Isolados de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 4b e 1/2b já foram descritos como geneticamente relacionados, e pertencentes a linhagem I (Ragon et al., 2008), conforme observado no presente estudo (Figura 1).

O grupo 3 também foi composto por isolados de diferentes sorotipos. Seis isolados apresentaram entre si similaridade genética de 90%, sendo quatro do sorotipo 1/2c ou 3c (dos quais três apresentaram 100% de similaridade), e dois do sorotipo 4b atípico (Figura 1). Considerando esses resultados, percebe-se uma diversidade de isolados obtidos de uma mesma amostra com diferentes perfis genéticos e sorotipos. A presença de isolados de diferentes sorotipos num mesmo grupo genético definido por macro-restrição enzimática e PFGE, como observado para os grupos 2 e 3, já foi descrita anteriormente (Zhang et al., 2007).

Assim como o grupo 2, os isolados do grupo 4 apresentaram dois perfis genéticos distintos, com similaridade entre eles de 88%. Os dois pulsotipos foram compostos por 3 e 4 isolados, todos pertencentes ao sorotipo 4b atípico, e obtidos em diferentes coletas de amostras (Figura 1). Isolados do grupo 4 de um mesmo pulsotipo foram obtidos de diferentes amostras de cortes cárneos finais (L59, L80), indicando disseminação do mesmo no ambiente de processamento de carne bovina.

Cinco isolados apresentaram perfis genéticos idênticos e foram agrupados no grupo 5, e somente 1 isolado foi agrupado no grupo 6. Todos esses isolados foram caracterizados como pertencentes ao sorotipo 1/2c ou 3c, e rotas de contaminação puderam ser identificadas: isolados com perfis genéticos idênticos foram obtidos de mãos de manipuladores, facas e cortes cárneos finais (L01, L21, L35, L37) (Figura 1). Como observado anteriormente em outros grupos, os perfis genéticos obtidos por macro-restrição por *ApaI* e *AscI* permitiram a identificação das origens de contaminação

de diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, como descrito previamente (Lundén et al., 2003; Ochiai et al., 2010; Senczek et al., 2000).

Todos os isolados utilizados no presente estudo apresentaram em seu genoma os genes de virulência do grupo das internalinas (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*) como observado por Liu et al. (2007) em cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2c, 1/2b e 4b. Entretanto é necessário um mapeamento da região *inlA* para melhor caracterização do potencial de virulência dos isolados. Em um estudo conduzido por Sant'Ana et al. (2012), os autores verificaram que todos os isolados obtidos de vegetais prontos para consumo pertencentes aos sorotipos 1/2b e 4b apresentaram o gene *inlA* e 97% foram positivos para os genes *inlC* e *inlJ*. Os genes *hlyA*, *plcA*, *actA* e *iap* foram detectados em todos os isolados testados, como observado por Rawool et al. (2007) em cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b.

Cepas de *L. monocytogenes* envolvidas em infecções apresentam em seu genoma alguns genes que estão envolvidos no seu mecanismo de virulência. Alguns destes genes codificam proteínas que viabilizam um mecanismo característico de *L. monocytogenes* colonizar a célula hospedeira. A entrada na célula é mediada por duas proteínas de superfície do grupo das internalinas que interagem com receptores específicos das células hospedeiras, provocando a fagocitose (genes *inlA* e *inlB*). Após a internalização outras proteínas ajudam a bactéria escapar do fagossomo formado durante o processo: listeriolisina O (gene *hlyA*) e fosfolipases (genes *plcA* e *plcB*). Após a replicação no citoplasma da célula hospedeira, a invasão de células adjacentes é mediada pela proteína de superfície *actA* e da proteína do grupo das internalinas *inlC* (genes *actA* e *inlC*), onde o ciclo se inicia novamente (de las Heras et al., 2011). Isolados de *L. monocytogenes* que apresentam todo o fragmento *inlA* funcional estão mais associados a casos de listeriose, e isolados que apresentam essa região incompleta usualmente possuem menor potencial patogênico, sendo frequentemente encontrados

em alimentos e ambientes. Jacquet et al. (2004) demonstraram que todos os isolados dos sorotipos 1/2b e 4b recuperados de casos clínicos e alimentos apresentaram todo o fragmento inlA funcional e todos os isolados do sorotipo 1/2c, mesmo os de origem clínica, apresentaram este fragmento incompleto.

Nas últimas décadas vários estudos têm sido conduzidos com objetivo de verificar os perfis de resistência a antimicrobianos de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de casos clínicos em humanos e animais, e também de alimentos e ambientes industriais (Charpentier and Courvalin, 1999; Lungu et al., 2011). Os resultados obtidos de resistência a antimicrobianos nos 20 isolados selecionados estão apresentados na Tabela 2. De maneira geral, os isolados apresentaram sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados, como observado por (Wieczorek et al., 2012). Entretanto, todos os isolados testados, exceto um pertencente ao grupo 2 e sorotipo 1/2b, 3b, ou 7, apresentaram resistência a sulfametoxazole. Dois isolados apresentaram resistência a trimetoprim, que combinada com sulfametoxazole é considerada uma alternativa para o tratamento de listeriose. A multirresistência a essas duas drogas, ou a resistência a apenas uma, é preocupante, pois o sinergismo usualmente observado pela combinação destas drogas pode ser prejudicado (Charpentier and Courvalin, 1999; White et al., 2002).

Dois isolados pertencentes aos grupos 1 e 6, ambos pertencentes ao sorotipo 1/2c ou 3c, foram resistentes a cinco antimicrobianos: gentamicina, tobramicina, clindamicina, trimetoprim, e sulfametoxazole. Algumas dessas substâncias antimicrobianas são usualmente utilizadas para o tratamento de listeriose, e outras são alternativas para o tratamento da doença (Swaminathan and Gerner-Smidt, 2007). Resultados similares foram obtidos por Zhang et al. (2007), que verificaram uma alta frequência de isolados obtidos de alimentos prontos para o consumo com resistência à sulfonamida. A múltipla resistência de *L. monocytogenes* a antimicrobianos já foi

verificada anteriormente (Korsak et al., 2012; Rodas-Suárez et al., 2006; Srinivasan et al., 2005; Wang et al., 2013) e remete a grande preocupação em saúde pública, pois indica dificuldade de tratamentos médicos em pacientes com listeriose potencialmente causada por essas cepas (Angulo and Molbak, 2005).

Adicionalmente, oito isolados apresentaram resistência intermediária a eritromicina, dentre os quais três pertencem ao sorotipo 1/2c ou 3c (grupos 1 e 3) e cinco ao sorotipo 4b atípico (grupos 3 e 4) (Tabela 2). De acordo com (Roberts et al., 1996) a resistência a eritromicina pode estar relacionada a transmissão de material genético entre espécies. Três isolados do sorotipo 1/2c (grupos 1 e 5) também apresentaram resistência intermediária a clindamicina, como observado por Conter et al. (2009) e Wiczorek et al. (2012). A resistência intermediária ou completa a antimicrobianos é usualmente associada ao uso abusivo de drogas no tratamento de diversas enfermidades nos animais e seres humanos, além de possível transferência de genes relacionados a resistência entre micro-organismos de um mesmo ambiente (Charpentier and Courvalin, 1999; Miriagou et al., 2006). Considerando a diversidade genética dos isolados observada no presente estudo (Figura 1), transferências de material genético entre as diferentes cepas podem ocorrer, uma vez que todas se encontram no mesmo ambiente e em contato direto (Courvalin, 2008).

Os dados obtidos indicam a persistência de cepas de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de carne bovina considerado no estudo, assim como possíveis rotas de contaminação, e a ocorrência de isolados multi-resistentes a antimicrobianos usualmente utilizados no tratamento de listeriose. A ocorrência de cepas resistentes sugere a troca de material genético entre as cepas de *L. monocytogenes* e outras espécies, disseminados no ambiente de processamento de carne bovina considerado no presente estudo.

Agradecimentos

CNPq, CAPES e FAPEMIG.

Referências

- Angulo, F.J., Molbak, K. 2005. Human Health Consequences of Antimicrobial Drug Resistant *Salmonella* and Other Foodborne Pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 41, 1613-1620.
- Barros, M.A., Nero, L.A., Silva, L.C., d'Ovidio, L., Monteiro, F.A., Tamanini, R., Fagnani, R., Hofer, E., Beloti, V. 2007. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. *Meat Science* 76, 591-596.
- Charpentier, E., Courvalin, P. 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43, 2103-2108.
- Conter, M., Paludi, D., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Ianieri, A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 128, 497-500.
- Courvalin, P. 2008. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of Internal Medicine* 264, 4-16.
- de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vázquez-Boland, J.A. 2011. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* 14, 118-127.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C., Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 3819-3822.
- Fugett, E.B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N.B., Corby, J., Wiedmann, M. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *Listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE types. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 865-873.
- Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., Luethy, J. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. *Journal of Applied Microbiology* 70, 372-379.

- Gianfranceschi, M.V., D'Ottavio, M.C., Gattuso, A., Bella, A., Aureli, P. 2009. Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002–2005). *Food Microbiology* 26, 520-526.
- Graves, L.M., Swaminathan, B. 2001. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65, 55-62.
- Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J.I., Martin, P.M., Cossart, P., Lecuit, M. 2004. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Journal of Infectious Diseases* 189, 2094-2100.
- Korsak, D., Borek, A., Daniluk, S., Grabowska, A., Pappelbaum, K. 2012. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. *International Journal of Food Microbiology* 158, 203-208.
- Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Kuningas, M., Pölsama, P., Elias, T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30, 24-29.
- Liu, D.Y., Lawrence, M.L., Austin, F.W., Ainsworth, A.J. 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* 71, 133-140.
- Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H. 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science* 87, E6-E12.
- Lundén, J.M., Autio, T.J., Sjöberg, A.M., Korkeala, H.J. 2003. Persistent and Nonpersistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Meat and Poultry Processing Plants. *Journal of Food Protection* 66, 2062-2069.
- Lungu, B., O'Bryan, C.A., Muthaiyan, A., Milillo, S.R., Johnson, M.G., Crandall, P.G., Ricke, S.C. 2011. *Listeria monocytogenes*: Antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathogens and Disease* 8, 569-578.
- Mead, P., Dunne, E., Graves, L., Wiedmann, M., Patrick, M., Hunter, S., Salehi, E., Mostashari, F., Craig, A., Mshar, P. 2006. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection* 134, 744-751.
- Miriagou, V., Carattoli, A., Fanning, S. 2006. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes and Infection* 8, 1923-1930.
- Møretrø, T., Langsrud, S. 2004. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms* 1, 107-121.

- Morvan, A., Moubareck, C., Leclercq, A., Hervé-Bazin, M., Bremont, S., Lecuit, M., Courvalin, P., Le Monnier, A. 2010. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 2728-2731.
- Notermans, S., Dufrenne, J., Leimeister-Wächter, M., Domann, E., Chakraborty, T. 1991. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2666-2670.
- Ochiai, Y., Yamada, F., Batmunkh, O., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., Ueda, F. 2010. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area. *Journal of Food Protection* 73, 1688-1693.
- Orsi, R.H., Bakker, H.C.d., Wiedmann, M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301, 79-96.
- Paziak Domańska, B., Bogusławska, E., Więckowska Szakiel, M., Kotłowski, R., Różalska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dąbrowski, W., Rudnicka, W. 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiology Letters* 171, 209-214.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A. 2010. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control* 21, 708-713.
- Ragon, M., Wirth, T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Le Monnier, A., Brisse, S. 2008. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PLoS Pathogens* 4, e1000146.
- Rawool, D.B., Malik, S.V.S., Barbuddhe, S.B., Shakuntala, I., Aurora, R.A. 2007. A multiplex PCR for detection of virulence associated genes in *Listeria monocytogenes*. *Internet Journal of Food Safety* 9, 56-62.
- Roberts, M.C., Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P.E. 1996. Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 269-270.
- Rodas-Suárez, O., Flores-Pedroche, J., Betancourt-Rule, J., Quiñones-Ramírez, E.I., Vázquez-Salinas, C. 2006. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 7410-7412.

- Sant'Ana, A.S., Igarashi, M.C., Landgraf, M., Destro, M.T., Franco, B. 2012. 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* 155, 1.
- Senczek, D., Stephan, R., Untermann, F. 2000. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. *International Journal of Food Microbiology* 62, 155-159.
- Shen, J., Rump, L., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, X., Meng, J. 2013. Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiology* 35, 58-64.
- Srinivasan, V., Nam, H., Nguyen, L., Tamilselvam, B., Murinda, S., Oliver, S. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease* 2, 201-211.
- Suárez, M., González-Zorn, B., Vega, Y., Chico-Calero, I., Vázquez-Boland, J.A. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology* 3, 853-864.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 584-640.
- Vitas, A.I., Maria Sanchez, R., Aguado, V., Garcia-Jalon, I. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. *Journal of Food Protection* 70, 2402-2406.
- Wang, X.-M., Lü, X.-F., Yin, L., Liu, H.-F., Zhang, W.-J., Si, W., Yu, S.-Y., Shao, M.-L., Liu, S.-G. 2013. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control* 32, 153-158.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P. 2008. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 7629-7642.
- White, D.G., Zhao, S., Simjee, S., Wagner, D.D., McDermott, P.F. 2002. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection* 4, 405-412.
- Wieczorek, K., Dmowska, K., Osek, J. 2012. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from bovine hides and carcasses. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2043-2045.

Zhang, Y., Yeh, E., Hall, G., Cripe, J., Bhagwat, A.A., Meng, J. 2007. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. International Journal of Food Microbiology 113, 47-53.

Table 1. Isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos em uma planta de processamento de carne bovina localizada no Estado de Minas Gerais, Brasil.

Origem	Amostra	n	Sorotipo*			Identificação
			1/2c ou 3c	1/2b, 3b ou 7	4b atípico	
Utensílio	Faca Limpa	1	1	-	-	L01
Equipamentos	Mesa Limpa	3	3	-	-	L02 – L04
	Mesa suja	9	9	-	-	L05 – L13
Mãos de manipuladores	Mão Limpa	14	9	-	5	L14 – L27
	Mão suja	8	8	-	-	L28 – L35
Cortes finais	Alcatra	13	7	-	6	L36 – L48
	Filé mignon	14	12	-	2	L49 – L62
	Paleta	34	25	7	2	L63 – L96
	Total	96	74	7	15	-

* Sorotipo 1/2c ou 3c: Amplificação dos fragmentos *prs*, *lmo0737*, e *lmo1118*; 1/2b, 3b ou 7: *prs*, *ORF2819*; 4b, 4d ou 4e: *prs*, *ORF2819*, e *ORF 2110*; 4b atípico: *prs*, *ORF2819*, *ORF2110*, e *lmo0737*; 4b atípico: *prs*, *ORF2819*, *ORF2110*, *lmo0737*, e *lmo1118*.

Tabela 2. Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g/mL}$) de substâncias antimicrobianas sobre 20 isolados selecionados de *Listeria monocytogenes* (perfis genéticos por PFGE, Figura 1) e seus respectivos perfis de resistência (R: resistente, S: susceptível, I: resistência intermediária).

Grupo PFGE	Isolado	Sorotipo	Antimicrobianos*														
			AMP	VA	KM	CN	SM	TM	E	TE	MC	CIP	CL	DA	RI	TR	SX
1	L15	1/2c ou 3c	.06 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	6 (S)	.25 (S)	.03 (S)	.12 (S)	.016 (S)	.25 (S)	.75 (S)	.5 (S)	.016 (S)	.032 (S)	R
1	L17	1/2c ou 3c	.06 (S)	1 (S)	2 (S)	.5 (S)	3 (S)	.25 (S)	.06 (I)	.03 (S)	.016 (S)	.5 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	.023 (S)	.032 (S)	R
1	L20	1/2c ou 3c	.06 (S)	.25 (S)	3 (S)	.5 (S)	6 (S)	.38 (S)	.03 (S)	.12 (S)	.023 (S)	.25 (S)	1.0 (S)	.5 (S)	.008 (S)	.047 (S)	R
1	L34	1/2c ou 3c	.12 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	6 (S)	.50 (S)	.03 (S)	.03 (S)	.032 (S)	.5 (S)	1.0 (S)	.5 (S)	.016 (S)	.032 (S)	R
1	L58	1/2c ou 3c	.12 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	8 (S)	.38 (S)	.03 (S)	.06 (S)	.016 (S)	.5 (S)	1.5 (S)	1 (I)	.016 (S)	.047 (S)	R
1	L42	1/2c ou 3c	.12 (S)	.12 (S)	48 (I)	16 R	64 (S)	24 R	.06 (I)	.03 (S)	.016 (S)	.5 (S)	1.5 (S)	4 (R)	1.0 (S)	R	R
1	L69	1/2c ou 3c	.12 (S)	1 (S)	2 (S)	.5 (S)	6 (S)	.19 (S)	.03 (S)	.12 (S)	.032 (S)	.5 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	.008 (S)	.047 (S)	R
1	L72	1/2c ou 3c	.06 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	6 (S)	.38 (S)	.03 (S)	.03 (S)	.032 (S)	.5 (S)	.50 (S)	.25 (S)	.012 (S)	.023 (S)	R
1	L76	1/2c ou 3c	.06 (S)	2 (S)	3 (S)	.5 (S)	8 (S)	.38 (S)	.03 (S)	.03 (S)	.016 (S)	.25 (S)	.75 (S)	.25 (S)	.012 (S)	.023 (S)	R
1	L90	1/2c ou 3c	.06 (S)	1 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	4 (S)	.50 (S)	.03 (S)	.12 (S)	.023 (S)	.5 (S)	1.0 (S)	1 (I)	.016 (S)	.023 (S)	R
2	L45	4b atípico	.06 (S)	.25 (S)	2 (S)	.25 (S)	4 (S)	.50 (S)	.015 (S)	.03 (S)	.016 (S)	.5 (S)	1.0 (S)	.5 (S)	.008 (S)	.032 (S)	R
2	L74	1/2b, 3b ou 7	.06 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	3 (S)	.50 (S)	.015 (S)	.06 (S)	.016 (S)	.06 (S)	.75 (S)	.03 (S)	.023 (S)	.016 (S)	32 (S)
3	L23	1/2c ou 3c	.12 (S)	.5 (S)	2 (S)	.5 (S)	6 (S)	.50 (S)	.06 (I)	.12 (S)	.016 (S)	.5 (S)	.50 (S)	.5 (S)	.006 (S)	.064 (S)	R
3	L26	4b atípico	.06 (S)	.12 (S)	2 (S)	.25 (S)	6 (S)	.25 (S)	.06 (I)	.03 (S)	.032 (S)	.12 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	.012 (S)	.047 (S)	R
3	L27	4b atípico	.06 (S)	.12 (S)	2 (S)	.25 (S)	6 (S)	.25 (S)	.06 (I)	.03 (S)	.032 (S)	.12 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	.012 (S)	.047 (S)	R
3	L39	1/2c ou 3c	.03 (S)	2 (S)	1.5 (S)	.5 (S)	6 (S)	.50 (S)	.015 (S)	.25 (S)	.016 (S)	.25 (S)	.75 (S)	.5 (S)	.016 (S)	.047 (S)	R
4	L24	4b atípico	.12 (S)	.12 (S)	3 (S)	.25 (S)	6 (S)	.25 (S)	.06 (I)	.06 (S)	.023 (S)	.12 (S)	.75 (S)	.25 (S)	.032 (S)	.032 (S)	R
4	L59	4b atípico	.12 (S)	1 (S)	2 (S)	.5 (S)	8 (S)	.50 (S)	.06 (I)	.12 (S)	.032 (S)	.25 (S)	1.5 (S)	.25 (S)	.032 (S)	.064 (S)	R
4	L80	4b atípico	.25 (S)	1 (S)	2 (S)	.25 (S)	6 (S)	.38 (S)	.06 (I)	.12 (S)	.023 (S)	.25 (S)	1.0 (S)	.12 (S)	.023 (S)	.032 (S)	R
5	L40	1/2c ou 3c	.12 (S)	.25 (S)	3 (S)	1 (S)	6 (S)	.38 (S)	.03 (S)	.12 (S)	.016 (S)	.5 (S)	1.5 (S)	1 (I)	.012 (S)	.064 (S)	R
6	L41	1/2c ou 3c	.12 (S)	.06 (S)	24 (I)	16 (R)	64 (S)	16 (R)	.03 (S)	8 (I)	3 (S)	.5 (S)	.75 (S)	4 (R)	.006 (S)	R	R

* Antimicrobianos: Ampicilina (AMP); Vancomicina (VA); kanamicina (KM); Gentamicina (CN); Estreptomicina (SM); Tobramicina (TM); Eritromicina (E); Tetraciclina (TE); Minociclina (MC); Ciprofloxacina (CIP); Cloranfenicol (CL); Clindamicina (DA); Rifampicina (RI); Trimetoprim (TR); Sulfametoxazole (SX).

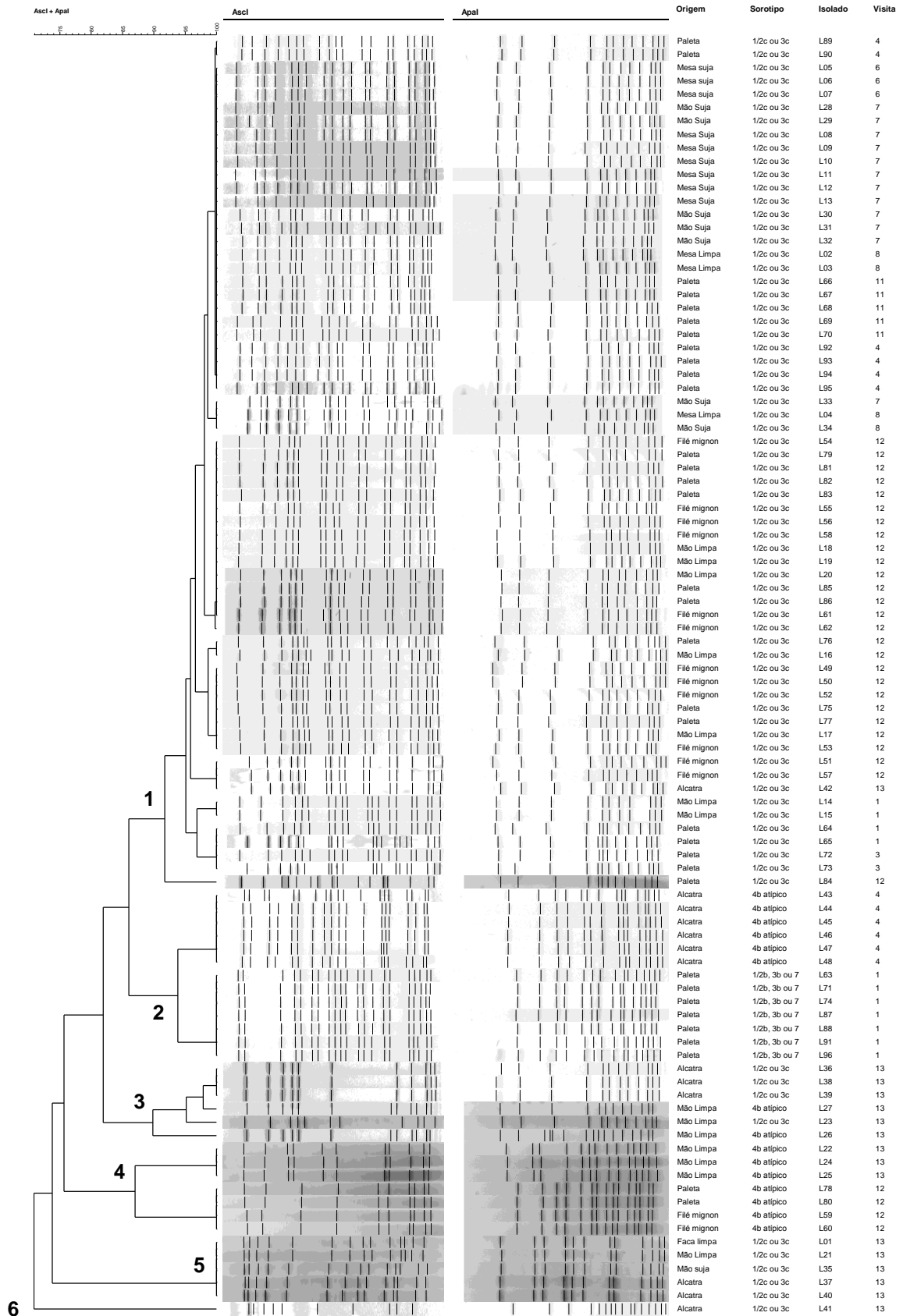


Figura 1.

Figura 1. Dendograma dos pulsotipos obtidos por *ApaI* e *AscI* e PFGE de 96 isolados de *Listeria monocytogenes*, seus locais de isolamento, sorotipos, identificação e visitas em que foram obtidos de um ambiente de processamento de carne bovina localizado no Estado de Minas Gerais, Brasil.

CONCLUSÕES

- O presente estudo constatou que *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* estão amplamente distribuídas no ambiente de processamento de carne bovina e cortes cárneos.
- Foi observada uma diversidade de sorotipos entre os isolados obtidos, mas o sorotipo 1/2c ou 3c foi o mais comum e alguns isolados apresentaram um perfil atípico pela sorologia molecular por PCR multiplex; estes isolados foram classificados como sorotipo 4b atípico e alguns tiveram seus fragmentos atípicos sequenciados e as suas respectivas sequencias foram depositadas no GenBank.
- PFGE e sorotipagem mostrou uma diversidade genética entre os isolados e indicou possíveis rotas de contaminação dentro do ambiente de processamento de carne bovina.
- Todos os isolados foram positivos para todos os genes de virulência indicando o potencial de virulência destes isolados. Entretanto é necessário o sequenciamento completo do fragmento *inlA* para melhor caracterização do potencial de virulência destes isolados.
- No geral, os isolados foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados, entretanto, alguns isolados apresentaram múltipla resistência a antimicrobianos utilizados no tratamento de listeriose o que representa uma preocupação em saúde pública.

ANEXOS

Metodologias e Resultados Detalhados

Metodologia

Coleta de amostras

Um frigorífico localizado no estado de Minas Gerais, Brasil foi selecionado para o presente estudo. Neste estabelecimento é realizado abate de bovinos e processamento da carne até obtenção de cortes finais. O local foi visitado 13 vezes durante o estudo. Ao longo do período foram coletadas amostras superficiais de facas (n=26), mesas (n=78) e mãos de manipuladores (n=74). Também foram avaliados alguns cortes tradicionalmente comercializados no Brasil: Alcatra (n=32), filé mignon (n=30) e paleta (n=32). As amostras foram coletadas em quatro áreas limitadas por moldes plásticos estéreis (100 cm² cada) utilizando esponjas estéreis (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA) previamente umedecidas com 10 mL de água peptonada 0,1% w/v (Oxoid Ltd., Basingstoke, England). Todas as amostras foram armazenadas em sacos plásticos estéreis (18-OZ Whirl-Pak Speci-Sponge Environmental Sampling bag Nasco Ltd., Fort Atkinson, WI, EUA) e mantidas sob-refrigeração durante o transporte até o laboratório, onde as análises foram iniciadas no mesmo dia.

Em condições assépticas, cada conjunto de amostras superficiais (obtidas nas quatro áreas) foi adicionado de 160 mL de solução salina peptonada (Oxoid) (completando o volume de 200 mL) e submetido à homogeneização automática por 60 s (Stomacher 400 circulator, Seward LTD, Easting Close, Sussex, UK). Alíquotas de 40 mL (representando 80 cm² de cada amostra) foram submetidas à análise microbiológica para identificação de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp.

Isolamento de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*

Os protocolos ISO 11.290-1 and ISO 11.290-2, com modificações, foram adotados neste estudo. Alíquotas 40 mL foram centrifugadas a 4°C durante 15 minutos (1.000 x g), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi suspenso em 10 mL de half-

Fraser broth (Oxoid), seguido de incubação a 30 °C por 24 horas. Então, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para Fraser broth (Oxoid) e incubado a 37 °C, a leitura foi feita entre 24 e 48 h.

Com o auxílio de uma alça de Henle, após cada enriquecimento seletivo (primário e secundário) uma alíquota foi estriada em Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA) e Ágar Oxford Modificado (Oxford), com incubação a 35° C por 24-48 horas. No ágar Oxford modificado as colônias típicas de *Listeria* spp. apresentam coloração negra, referente à hidrólise da esculina e no agar ALOA apresentam-se azul esverdeadas. No ALOA colônias de *L. monocytogenes* apresentam um halo ao redor, essa característica é devido à presença da enzima lecitinase.

Em média três colônias suspeitas de *Listeria* spp. de ambos os meios de cultura, foram transferidas para placas de ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid) com 0,6% de extrato de levedura para purificação das colônias, com incubação a 37° C por 24 horas. Em seguida foi verificada a característica típica de *Listeria* spp. sob luz transmitida a 45° (método de Henry) e as colônias foram submetidas à identificação bioquímica de acordo como descrito por Pagotto et al. (2006): produção de catalase, e motilidade a 25°C, hemólise em agar sangue de cavalo desfibrilado (7% v/v) e foram analisados os padrões de fermentação dos carboidratos dextrose, xilose, ramnose e manitol. Todas as provas foram realizadas utilizando também um controle positivo (*L. monocytogenes* ATCC 7644), para descartar qualquer falha dos reagentes ou de preparo dos meios de cultura utilizados. Considerando os resultados obtidos nos testes bioquímicos, as espécies foram identificadas conforme descrito na Tabela 1 (Revisão bibliográfica).

Reativação de culturas e extração do DNA

Todos os isolados foram mantidos em estoques de caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid) suplementados com glicerol a 20 % (v/v), e armazenados a -20°C. Para

utilização, alíquotas das culturas foram estriadas em TSA, incubadas a 35 °C por 24 h, e colônias isoladas eram transferidas para TSB, com incubação a 35 °C por 24 h. Alíquotas de 1 mL foram centrifugadas a 15000 × g por 3 min. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e o DNA do pellet de células de cada cultura extraído de acordo com protocolo do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). Após extração, a presença de DNA foi verificada por eletroforese em agarose a 1 % (v/v), coradas com GelRed (Biotium) e a visualização foi feita utilizando luz ultravioleta. DNA dos isolados foram submetidos a reações de PCR para diferenciação dos principais sorotipos e detecção dos genes de virulência.

Sorotipagem molecular e detecção de genes relacionados à patogenicidade

O DNA de todos os isolados foi submetido a PCR multiplex para diferenciação dos principais sorotipos, de acordo com o método de Doumith et al. (2004), com modificações (Tabela 2). Reações de 25 µL foram compostas por 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2.0 µL de DNA, 8.4 µL dos cinco pares de primers (1 pmol), e 2.1 µL de água ultra pura para PCR (Promega). As condições das reações foram: 94°C durante 3 min; 35 cycles de 94°C durante 0.4 min, 53°C durante 1.15 min, 72°C durante 1.15 min; e 72°C durante 7 min. Para observação dos resultados das amplificações, 5µL da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% (w/v) diluído em tampão 0.5 × Tris/Borate/EDTA buffer, corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), e visualizado através de transilluminator.

Os DNAs dos isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos a reações de PCR para a detecção dos genes de virulência envolvidos nos processos de invasão celular. Os protocolos utilizados para detecção desses genes de virulência foram os descritos por Liu et al. (2007) e Rawool et al. (2007). Para investigação dos genes *inlA*, *inlC* e *inlJ*, do grupo das internalinas, foi utilizado um protocolo de PCR multiplex, e para o gene

inlB um protocolo de PCR convencional. Adicionalmente, os genes hlyA, actA e iap foram pesquisados por um protocolo de PCR multiplex, e o gene plcA foi pesquisado com um protocolo de PCR convencional (Tabela 2). Em todas os protocolos, reações com volume final de 25 µL era composto por 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 2.0 µL de DNA, 1.0 µL de cada primer na concentração de 10 pmol, e água ultrapura para PCR (Promega) até completar o volume final. *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi utilizada como controle positivo para os genes investigados. A visualização dos produtos foi feita como descrita acima.

Os primers utilizados foram descritas por Doumith et al. 2004 (lmo0737, lmo1118, ORF2819, ORF2110, prs, todos na concentração de 1 pmol), Liu et al. 2007 (GenBank Accession No. NC_003210 inlA, inlB, inlC, inlJ, todos a 10 pmol), Notermans et al. 1991 (plcA, 10 pmol), Paziak-Domanska et al. 1999 (hlyA, 10 pmol), Suarez and Vazquez-Boland 2001 (actA, 10 pmol) and Furrer et al. 1991 (iap, 10 pmol).

Sequenciamento dos produtos atípicos obtidos pela sorologia molecular

Os isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4b atípico (positivo para lmo0737 e / ou lmo1118) foram submetidos a reações de PCR convencional utilizando os primers lmo0737 ou lmo1118, foram seguidas as mesmas condições de reações de PCR descritas acima. Os produtos foram submetidos à sequenciamento pela Macrogen Inc. (Seul, Coréia do Sul), e as sequências obtidas foram analisadas usando o software básico de alinhamento (BLAST, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) e comparadas com sequências disponíveis no banco de dados disponível no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Tabela 1. Detalhes sobre primers, genes alvos e condições das reações de PCR para sorotipagem e detecção de genes de virulência de *L. monocytogenes*.

purpose	PCR set	target gene	Sequences (5'→3')*	product size (bp)	PCR conditions
serotyping	multiplex	<i>lmo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCATTC	691	25 µL, 94 °C for 3 min, 35 cycles at 94 °C for 0.40 min, 53 °C for 1.15 min, 72 °C for 1.15 min, 72 °C for 7 min
		<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCGGCATACTTA	906	
		ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	
		ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: ATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	
		<i>prs</i>	F: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	
		virulence	multiplex	<i>inlA</i>	
<i>inlC</i>	F: AATCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA			517	
<i>inlJ</i>	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA			238	
simplex	<i>inlB</i>		F: TGGGAGAGTAACCCAACCAC R: GTTGACCTTCGATGGTTGCT	884	25 µL, 94 °C for 2 min, 30 cycles at 94 °C for 20 s, 55 °C for 20 s, 72 °C for 50 s, 72 °C for 2 min
simplex	<i>plcA</i>		F: CTGCTTGAGCGTTCATGTCTC ATCCCCC R: ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	1484	25 µL, 95 °C for 2 min, 35 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1.5 min, 72 °C for 10 min
multiplex	<i>hlyA</i>		F: GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA R: GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	456	25 µL, 95 °C for 2 min, 35 cycles at 95 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, 72 °C for 1.5 min, 72 °C for 10 min
	<i>actA</i>		F: CGCCGCGGAAATTAATAAAGA R: ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	839	
	<i>iap</i>		F: ACAAGCTGCACCTGTTGCAG R: TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	131	

Caracterização por PFGE

Todas as culturas obtidas foram submetidas à extração de DNA cromossomal de acordo com o protocolo recomendado pelo Center for Diseases Control and Prevention (PulseNet) para subtipagem de *L. monocytogenes* (Graves and Swaminathan, 2001). e a digestão enzimática foi feita utilizando as enzimas AscI e ApaI (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EUA). Os produtos da macrorrestrrição foram separados por eletroforese em gel de agarose (Agarose Seakem Gold 1% em tampão TE 0,5X), utilizando o equipamento CHEF-DR II (BioRad, Philadelphia, NY, EUA) com os seguintes parâmetros: gradiente de 6 V/cm; switch time inicial, 4s; switch time final, 40s; e tempo de corrida de 20 horas. Os géis obtidos foram corados em banhos com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), e os padrões de digestão foram visualizados por luz ultravioleta, e as imagens obtidas analisadas pelos software BioNumerics (version 6.6 Applied Maths, Gand Bélgica). Salmonella Braenderup (H9812) digerida com XbaI (Promega Corp., Madison, WI, EUA) foi utilizada como referência para normalização das imagens e uma de tolerância de 5% para posição das bandas foi aplicada.

Resistência a antimicrobianos

Considerando os perfis genéticos obtidos por PFGE, 20 isolados foram selecionados, representando cada um dos pulsotipos identificados, e submetidos a testes fenotípicos para identificação de seus perfis de resistência a 15 diferentes antimicrobianos, utilizando-se fitas Etest® (bioMérieux, L'Etoile, França) (rifampicina, trimetoprin, tobramicina, kanamicina, minociclina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol) e M.I.C.Evaluators™ (Oxoid) (clindamicina, eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, vancomicina, gentamicina, ampicilina). Alíquotas de 0.1 mL das culturas selecionadas foram transferidas para caldo infusão de cérebro e coração

(BHI, Oxoid), incubadas a 35 °C por 18 to 24 h, e diluídas em NaCl 0.85% até obtenção de uma turbidez semelhante à escala 0.5 de MacFarland. Com auxílio de swabs estéreis, alíquotas das culturas selecionadas e diluídas foram distribuídas de maneira uniforme na superfície de placas contendo ágar BHI (Oxoid), e após absorção completa da cultura, adicionadas de fitas Etest® (BioMérieux) ou M.I.C.Evaluators™ (Oxoid). As placas foram então incubadas a 35 °C, e as leituras realizadas após 18 e 24 h, identificando-se os valores de concentração mínima inibitória para cada substância antimicrobiana e cultura selecionada. Considerando os resultados obtidos, cada cultura foi classificada como sensível, resistente, ou com resistência intermediária a cada um dos antimicrobianos testados, conforme orientações dos fabricantes.

Resultados Detalhados

Tabela 2: Resultados dos testes bioquímicos para identificação de *Listeria monocytogenes*.

Isolado	Visita	Origem	Ferment. carboidratos				Mot.	Hem.	Cat.	Identificação
			xil	man	dex	ram				
L01	13	Faca limpa	-	-	+	-	+	-	+	<i>L. innocua</i> *
L02	8	Mesa Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L03	8	Mesa Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L04	8	Mesa Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L05	6	Mesa suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L06	6	Mesa suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L07	6	Mesa suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L08	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L09	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L10	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L11	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L12	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L13	7	Mesa Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L14	1	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L15	1	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L16	12	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L17	12	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L18	12	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L19	12	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L20	12	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L21	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L22	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L23	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L24	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L25	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L26	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L27	13	Mão Limpa	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L28	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L29	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L30	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L31	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L32	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L33	7	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L34	8	Mão Suja	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L35	13	Mão suja	-	-	+	-	+	-	+	<i>L. innocua</i> *
L36	13	Alcatra	-	-	+	-	+	-	+	<i>L. innocua</i> *
L37	13	Alcatra	-	-	+	-	+	-	+	<i>L. innocua</i> *
L38	13	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L39	13	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L40	13	Alcatra	-	-	+	+	+	-	+	<i>L. innocua</i> *
L41	13	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L42	13	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L43	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L44	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L45	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L46	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L47	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>

Continuação da Tabela 2

Isolado	Visita	Origem	Ferment. carboidratos				Mot.	Hem.	Cat.	Identificação
			xil	man	dex	ram				
L48	4	Alcatra	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L49	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L50	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L51	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L52	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L53	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L54	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L55	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L56	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L57	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L58	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L59	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L60	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L61	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L62	12	Filé mignon	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L63	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L64	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L65	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L66	11	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L67	11	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L68	11	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L69	11	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L70	11	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L71	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L72	3	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L73	3	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L74	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L75	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L76	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L77	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L78	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L79	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L80	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L81	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L82	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L83	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L84	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L85	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L86	12	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L87	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L88	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L89	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L90	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L91	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L92	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L93	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L94	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L95	4	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
L96	1	Paleta	-	-	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>

* Isolados identificados inicialmente como *L. innocua* por testes bioquímicos

Tabela 3: Resultados da PCR multiplex para sorotipagem de *Listeria monocytogenes*.

Isolado	Genes pesquisados				prs	Sorotipo
	lmo 1118	lmo 0737	ORF 2110	ORF 2819		
L01	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L02	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L03	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L04	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L05	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L06	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L07	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L08	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L09	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L10	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L11	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L12	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L13	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L14	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L15	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L16	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L17	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L18	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L19	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L20	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L21	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L22	+	+	+	+	+	4b atípico
L23	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L24	+	+	+	+	+	4b atípico
L25	+	+	+	+	+	4b atípico
L26	+	+	+	+	+	4b atípico
L27	+	+	+	+	+	4b atípico
L28	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L29	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L30	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L31	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L32	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L33	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L34	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L35	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L36	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L37	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L38	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L39	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L40	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L41	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L42	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L43	-	+	+	+	+	4b atípico
L44	-	+	+	+	+	4b atípico
L45	-	+	+	+	+	4b atípico
L46	-	+	+	+	+	4b atípico
L47	-	+	+	+	+	4b atípico
L48	-	+	+	+	+	4b atípico
L49	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L50	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c
L51	+	+	-	-	+	1/2c ou 3c

Continuação da Tabela 3

Isolado	Genes pesquisados					Sorotipo
	lmo 1118	lmo 0737	ORF 2110	ORF 2819	prs	
L52	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L53	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L54	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L55	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L56	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L57	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L58	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L59	+	+	+	+	+	4b atípico
L60	+	+	+	+	+	4b atípico
L61	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L62	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L63	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L64	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L65	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L66	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L67	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L68	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L69	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L70	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L71	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L72	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L73	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L74	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L75	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L76	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L77	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L78	+	+	+	+	+	4b atípico
L79	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L80	+	+	+	+	+	4b atípico
L81	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L82	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L83	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L84	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L85	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L86	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L87	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L88	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L89	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L90	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L91	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>
L92	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L93	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L94	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L95	+	+	-	-	+	<i>1/2c</i> ou <i>3c</i>
L96	-	-	-	+	+	<i>1/2b</i> , <i>3b</i> ou <i>7</i>

Tabela 4: Resultados das reações de PCR para detecção dos genes de virulência.

Isolado	Genes de Virulência									
	<i>hlyA</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>plcA</i>	<i>actA</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i>	
L01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L29	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L35	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L38	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L39	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L41	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L42	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L43	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L44	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L46	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L47	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L51	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Continuação da Tabela 4

Isolado	Genes de Virulência									
	<i>hlyA</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>plcA</i>	<i>actA</i>	<i>hlyA</i>	<i>hlyA</i>	
L52	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L54	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L55	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L58	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L60	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L61	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L62	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L64	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L67	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L68	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L71	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L73	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L74	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L76	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L77	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L78	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L79	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L81	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L82	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L83	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L84	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L85	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L86	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L87	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L88	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L89	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L90	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L92	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L95	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

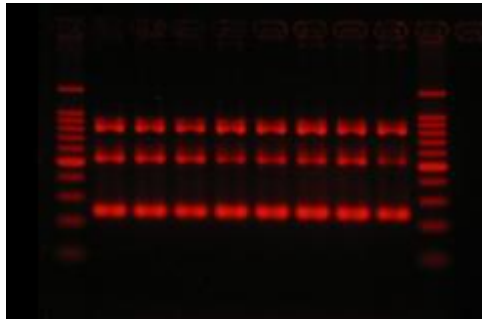


Figura1. Produtos da reação de PCR multiplex para detecção dos genes *inlA* (800bp), *inlC* (517 bp), *inlJ* (238bp).

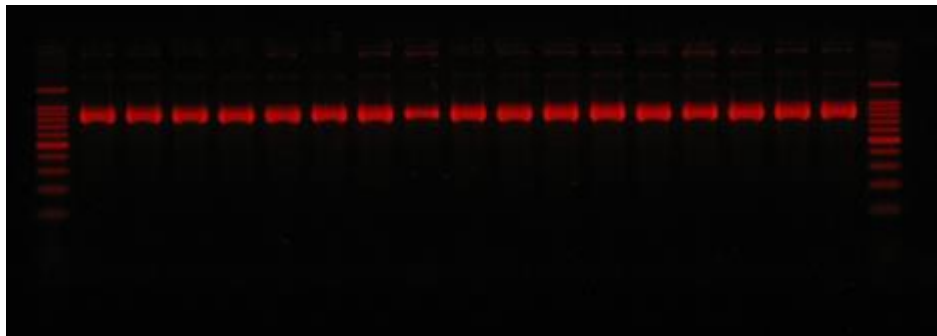


Figura 2. Produtos da reação de PCR convencional para detecção do gene *inlB* (884).

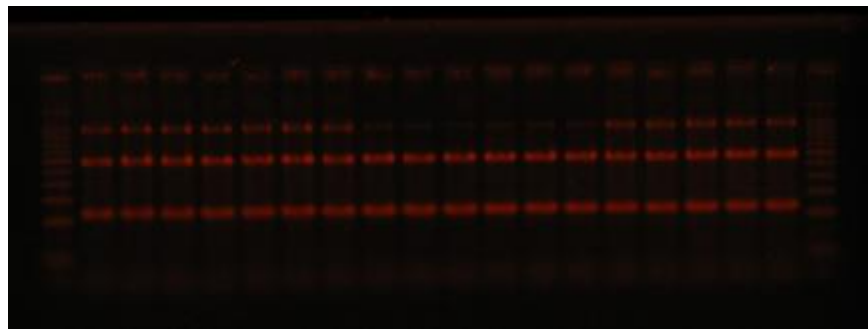


Figura 3. Produtos da reação de PCR multiplex para detecção dos genes *actA* (839 bp), *hlyA* (456 bp), *iap* (131 bp).

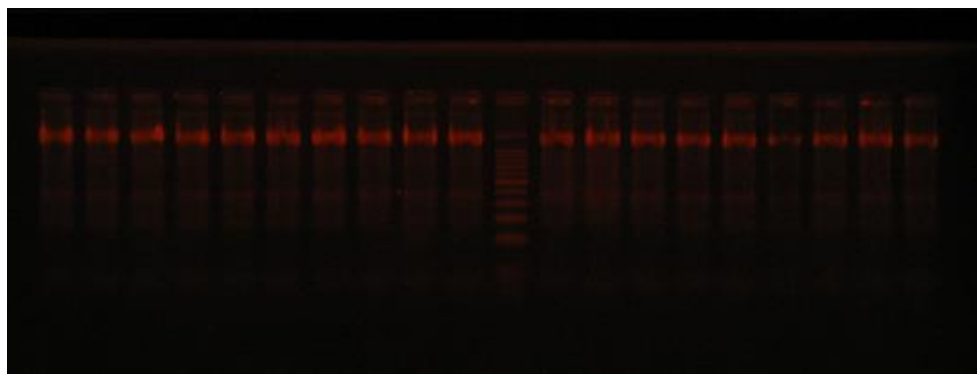


Figura 4. Produtos da reação de PCR convencional para detecção do gene *plc* (1484 bp).