

RAFAELA DE MELO TAVARES

***Listeria monocytogenes*: CARACTERIZAÇÃO DA ILHA DE
PATOGENICIDADE-3 (LIPI-3) E EXPRESSÃO DE *lvsX*
EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Tavares, Rafaela de Melo, 1991-

T231L 2019 *Listeria monocytogenes* : caracterização da Ilha de patogenicidade-3 (LIPI-3) e expressão de *llyX* em condições de estresse / Rafaela de Melo Tavares. - Viçosa, MG, 2019.

xii, 54f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês

Orientador: Luís Augusto Nero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

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

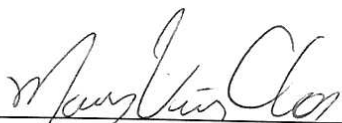
CDD 22. ed. 615.952937

RAFAELA DE MELO TAVARES

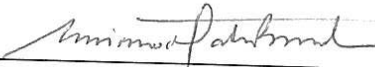
***Listeria monocytogenes*: CARACTERIZAÇÃO DA ILHA DE
PATOGENICIDADE-3 (LIPI-3) E EXPRESSÃO DE *IIsX*
EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE**

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*.

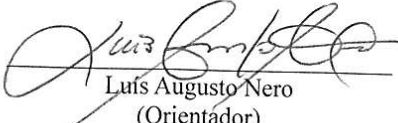
APROVADA: 24 de julho de 2019.



Marcus Vinícius Coutinho Cossi



Luciano dos Santos Bersot



Luís Augusto Nero
(Orientador)

“The capacity to blunder slightly is the real marvel of DNA,
without this special attribute, we would still be anaerobic bacteria
and there would be no music.” (Lewis Thomas)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Maria e Manoel e aos meus irmãos por todo incentivo em todos esses anos dedicados à minha formação acadêmica.

Agradeço ao meu orientador Luís Augusto Nero e ao meu Coorientador Ricardo Seiti Yamatogi por todo tempo e esforço dedicados na realização desse trabalho.

Agradeço aos amigos e técnicos do InsPOA e laboratórios associados pela amizade e colaboração acadêmica durante meu mestrado.

Agradeço ao Felipe por toda paciência e por ter cedido seu computador gamer para minhas análises de bioinformática.

Agradeço a todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma a esse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT	xi
INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2. Fatores de virulência e patogenia da listeriose	7
2.1. Ilhas de patogenicidade de <i>L. monocytogenes</i>	8
3. Ilha de patogenicidade-3 (LIPI-3).....	12
4. Técnicas moleculares na caracterização de fatores de virulência.....	15
JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	18
1. JUSTIFICATIVA	18
2. OBJETIVO GERAL	18
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPÍTULO 2	
SCIENTIFIC ARTICLE. <i>Listeria monocytogenes</i> : Pathogenic island 3 characterization and <i>llsX</i> expression in different stress conditions.....	28
ABSTRACT	29
1. INTRODUCTION	30
2. MATERIAL AND METHODS.....	32
2.1. Isolates selection for genomic analyses	32
2.2. Comparative analysis of LIPI-3	33
2.3. Evaluation of growth in different acid stress conditions	34

2.4. Gene expression analysis of LIPI-3	34
2.4.1. RNA extraction	35
2.4.2. Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR).....	36
3. RESULTS AND DISCUSSION.....	38
3.1. Comparative genomic analysis	38
3.2. SNP analysis of LIPI-3	41
3.3. Genomic expression analysis of LIPI-3 (RT-qPCR)	45
4. CONCLUSION	50
5. REFERENCES	51

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Ilha de Patogenicidade I de *Listeria monocytogenes* e expressão de genes sob o controle do *ativador transcricional PrfA*. FONTE: DE LAS HERAS et al., 2011.

Figura 2. Organização física e transcricional da ilha de patogenicidade I de *Listeria monocytogenes* e estrutura do locus em outras espécies de *Listeria* spp. FONTE: VÁZQUEZ BOLAND et al., 2001.

Figura 3. Comparação dos operons de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* associados à codificação dos peptídeos de virulência modificados. FONTE: COTTER et al., 2008.

CAPÍTULO 2

Figure 1. Flowchart of the experiment for expression of LIPI-3 virulence gene in response to different acid stress conditions.

Figure 2. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis comparison of the 8 LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) of the 4 different STs compared to reference strain F2365. ST1 isolates: CLIST1011, CLIST1015, CLIST3735; ST3 isolates: CLIST2083, CLIST2138, 7, CLIST441, CLIST3865, CLIST3869; ST218 isolates: 74, 1282 and ST 288 isolate: CLIST3870.

Figure 3. Representation of LIPI-3 island (*llsAGHXBYDP*). Alignment of the *llsa* gene of the four STs (3, 288, 1 and 218) compared to *llsa* gene of reference strain (F2365). Translation of *llsa* gene and LLS protein alignment of the four STs.

Figure 4. LLS sequence of the reference strain F2365 and LLS predicted sequence of strains harboring point mutations in the *llsA* gene (ST 218 and ST 288), designed by software CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman>).

Figure 5. Predicted structure of the translated *lisa* gene sequence for the reference strain F265 and for the ST 218 and ST 288 isolates. The sequences were predicted using RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/predict/>).

Figure 6. Results of growth in different acid stress conditions for the three *L. monocytogenes* isolates (**A.** F2365, **B.** CLIST441 and **C.** CLIST3870). Results are expressed in Log CFU/mL at different acid treatments during the incubation period (0, 2, 4, 6h). The pH 7.5 (control treatment) is represented by triangles, the pH 3.5 by squares and pH 4.5 by circles.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. *Listeria monocytogenes* isolates screened for LIPI-3 genes.

Table 2. Primers used for the genomic expression analysis of LIPI-3 (RT-qPCR).

Table 3. Results of *llsX* gene expression in RT-qPCR for the three isolates (F2365, CLIST441 and CLIST3870) in response to the different acid stress conditions and incubation times.

RESUMO

TAVARES, Rafaela de Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. ***Listeria monocytogenes*: Caracterização da ilha de patogenicidade-3 e expressão de *llsX* em condições de estresse.** Orientador: Luís Augusto Nero. Coorientador: Ricardo Seiti Yamatogi.

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar que devido ao seu caráter ubíquo representa um importante problema a saúde pública. *L. monocytogenes* pode ser classificado em quatro diferentes linhagens evolutivas (I, II, III e IV), e em termos de doença sabe-se que a maior parte dos casos clínicos de listeriose estão associados ao sorotipo 4b, pertencente a linhagem I. A presença da Ilha de Patogenicidade 3 (LIPI-3) de *L. monocytogenes* pode ser associada a maior virulência desses isolados, pois esta ilha codifica a Listeriolisina S (LLS), um fator de virulência necessário para a sobrevivência do patógeno *in vivo*. A LIPI-3 tem sido identificada predominantemente em cepas da linhagem I de *L. monocytogenes*, demonstrando a heterogeneidade da distribuição dos fatores de virulência nos diferentes sorotipos desse patógeno. Por esta razão o objetivo deste trabalho foi realizar pesquisa de genes da LIPI-3 em cepas de *L. monocytogenes*, por meio de análises comparativas entre as cepas positivas e testes fenotípicos para a expressão da LIPI-3 *in vitro* em diferentes condições de estresse ácido. Homólogos dos oito genes da LIPI-3 (*llsAGHXBYDP*) foram identificados em 43% dos 35 isolados pesquisados, sendo presente apenas nos isolados da linhagem I de *L. monocytogenes*. Dentre os isolados LIPI-3 positivos, foi possível observar menor polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) e mutações nos isolados ST1 (4b) e ST3 (1/2b), quando comparados com os isolados ST218 (4b) e ST 288 (1/2b). Essa menor variabilidade genética da LIPI-3 em cepas provenientes de isolados clínicos (4b), quando comparada com isolados provenientes de alimentos (1/2b), destaca a importância da LIPI-3 como fator de virulência. O gene *llsX* é altamente conservado entre os diferentes STs estudados e pode ser utilizado como marcador na identificação de LIPI-3 em *L. monocytogenes*. No entanto, a variação de (SNPs) entre os isolados dos diferentes sorotipos demonstrou a alteração do peptídeo final obtido de LLS nos isolados ST218 (4b) e 288 (1/2b), o que pode resultar em menor potencial de virulência destas cepas. Sendo assim, a identificação do gene *llsX* em *L. monocytogenes* não pode ser relacionada a maior virulência dos isolados, o que destaca a importância da pesquisa genotípica no estabelecimento da epidemiologia correta de listeriose. Com base nos resultados obtidos na etapa de pesquisa da LIPI-3 em *L. monocytogenes*, três isolados distintos foram selecionados para a avaliação da

expressão do gene *llsX* *in vitro* sob diferentes condições de estresse ácido; os resultados obtidos nesta etapa revelam diferenças significativas na expressão do gene *llsX*. Embora a expressão tenha sido observada para os dois sorotipos pesquisados (4b e 1/2a), a expressão de *llsX* após seis horas de estresse ácido só foi observada no isolado 4b, destacando a importância desse sorotipo e sua maior virulência associada em *L. monocytogenes*. Com o advento das novas técnicas de sequenciamento genético é possível realizar análises comparativas mais fidedignas e uma melhor classificação dos diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*. O estudo da variação genética pode levar a uma melhor compreensão da heterogeneidade no perfil de virulência entre os isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao mesmo sorotipo, assim como a um melhor entendimento da função de LLS como fator de virulência.

ABSTRACT

TAVARES, Rafaela de Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. ***Listeria monocytogenes*: pathogenic island-3 characterization (LIPI-3) and *llsX* expression in stress conditions.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-adviser: Ricardo Seiti Yamatogi.

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen and due to its ubiquitous characteristic represents an important public health concern. *L. monocytogenes* can be categorized into four different evolutionary lineages (I, II, III and IV); in terms of disease it is known that most clinical cases of listeriosis are associated with serotype 4b, lineage I. The presence of *L. monocytogenes* Pathogenicity Island 3 (LIPI-3) is associated with a higher virulence in some strains, since this island encodes for Listeriolysin S (LLS), a virulence factor necessary for the survival of the pathogen *in vivo*. LIPI-3 has been identified predominantly in lineage I of *L. monocytogenes*, highlighting the heterogeneity in the virulence among the different *L. monocytogenes* serotypes. Thus, the main purpose of this study was to research LIPI-3 genes in *L. monocytogenes* strains, to carry out comparative analysis between LIPI-3 positive strains, in association with phenotypic tests for LIPI-3 expression *in vitro* under different acid stress conditions. Homologues of the eight LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) were identified in 43% of the 35 isolates surveyed, being present only in isolates lineage I of *L. monocytogenes*. Among LIPI-3 positive isolates, it was possible to identify a lower single nucleotide polymorphism (SNP) and mutation profile in ST1 (4b) and ST3 (1/2b) isolates when compared to isolates ST218 (4b) and ST 288 (1/2b). The lower genetic variability of LIPI-3 in strains from clinical isolates (4b), when compared to isolates from food (1/2b), highlights the importance of LIPI-3 as a virulence factor. *llsX* gene was highly conserved in all isolates from different STs in this study and can be used as a marker to identify LIPI-3 in *L. monocytogenes* strains. However, the variation of (SNPs) between the isolates of the different serotypes revealed the alteration of the final peptide obtained (LLS) in isolates ST218 (4b) and 288 (1/2b), which may result in lower virulence potential of these strains. Thus, the identification of the *llsX* gene in *L. monocytogenes* cannot be associated to a high virulence activity or potential of the isolates. This finding highlights the importance of genetic research in establishing the correct epidemiology of listeriosis. Based on the results obtained in the LIPI-3 screening in *L. monocytogenes*, three distinct isolates were selected for expression evaluation of the *llsX* gene *in vitro* under different acid stress conditions, the results obtained in this step revealed significant differences in *llsX* expression, although the expression was observed for the two serotypes 4b and 1/2a, *llsX* expression after six hours of acid stress was

only observed in isolate 4b, highlighting the importance of this serotype and its association with higher virulence in *L. monocytogenes*. With the advent of new genetic sequencing techniques, it is possible to carry out more reliable comparative analyzes and to have a reliable characterization of the different *L. monocytogenes* serotypes. The study of the genetic variation can lead to a better understanding of the heterogeneity in the virulence profile among the isolates of *L. monocytogenes* belonging to the same serotype, as well as a better understanding of the function of LLS as a virulence factor.

INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar responsável por causar listeriose, doença de caráter severo que acomete principalmente indivíduos de grupos de risco como mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e pacientes imunossuprimidos. Embora apresente baixa incidência, sua taxa de mortalidade pode chegar a 30%. Este patógeno está amplamente distribuído no meio ambiente e já foi detectado em uma variedade de alimentos como leite, derivados lácteos, carne e alimentos prontos para consumo. Apesar da abundância de *L. monocytogenes* no ambiente, poucos indivíduos ficam seriamente doentes, o que pode ser em parte associado a diferenças na virulência das cepas presentes no ambiente.

L. monocytogenes pode ser classificado em quatro linhagens evolutivas distintas (I, II, III e IV), sendo grande parte dos isolados pesquisados pertencentes as linhagens I e II. A distribuição dos fatores de virulência entre as diferentes linhagens de *L. monocytogenes* é heterogênea, assim como sua distribuição em diferentes nichos ecológicos. Cepas da linhagem I possuem os sorotipos mais associados a surtos em humanos (1/2b e 4b) enquanto as cepas da linhagem II são frequentemente mais isoladas em alimentos e ambientes de processamento alimentar. Isolados das linhagens III e IV são raros e sua frequência é maior em ambientes de produção animal.

O monitoramento de *L. monocytogenes* envolve o uso de técnicas fenotípicas e moleculares de tipagem e a acurácia desses métodos é indispensável para a correta identificação do patógeno em tempo hábil, principalmente durante as investigações de surtos de origem alimentar. Baseando-se nos antígenos somáticos e flagelares, *L. monocytogenes* pode ser classificado em 13 diferentes sorotipos e embora seja considerado igualmente virulento pelas autoridades regulatórias, estudos mais recentes demonstram a heterogeneidade dos fatores de virulência atribuídos a alta patogenicidade de alguns sorotipos específicos.

A ilha de patogenicidade 3 (LIPI-3) descrita em estudos mais recentes possui especial importância no estudo da virulência de isolados de *L. monocytogenes*, pois codifica precursores para a produção e maturação de uma toxina, a Listeriolisina S (LLS), que possui função hemolítica e citotóxica. A LIPI-3 está presente predominantemente nos isolados da linhagem I e sabe-se que devido a capacidade bactericida apresentada por esta toxina estes isolados apresentam maior virulência em estudos *in vivo*, possuindo papel crucial na colonização intestinal e sobrevivência de *L. monocytogenes* durante a infecção.

Técnicas de sequenciamento completo do genoma podem fornecer informações sobre o perfil de virulência e patogenicidade, o que permite uma caracterização mais detalhada dos patógenos alimentares. As pesquisas genômicas fornecem informações poderosas sobre as características filogenéticas de *Listeria*, que poderão ser utilizadas para uma melhor caracterização de surtos de origem alimentar. Embora países mais desenvolvidos já estejam aderindo ao sequenciamento completo do genoma como ferramenta no rastreamento de surtos de doenças associadas ao consumo de alimentos, existem ainda poucos estudos relacionados a variação genômica dos isolados de *L. monocytogenes* conduzidos no Brasil.

Desta forma o objetivo desse trabalho foi identificar e caracterizar a ilha de patogenicidade 3, nas cepas de *L. monocytogenes* provenientes de isolados de cadeia de processamento alimentar, carnes cruas coletadas em abatedouros bovinos e cepas provenientes de isolados clínicos, e estudar a variação genômica das cepas sequenciadas, em associação com testes fenotípicos para a expressão da LIPI-3 *in vitro*.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Listeria monocytogenes

O gênero *Listeria* pertence a classe *Bacilli*, ordem I *Bacillales*, família IV *Listeriaceae* (GARRITY et al., 2004). Esse gênero possui 17 diferentes espécies; embora apresentem ecologia semelhante, apenas duas espécies são consideradas patogênicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (COSSART et al., 2011; LIU ., 2008; ORSI et al., 2016). *L. ivanovii* é especialmente patogênico em ruminantes, enquanto *L. monocytogenes* é frequentemente descrito como causador de doença em humanos, sendo considerado um importante patógeno de origem alimentar devido a severidade dos seus casos clínicos (ROCOURT J & BUCHRIESER, 2007).

Por possuir caráter ubíquo, *L. monocytogenes* pode ser encontrado em diversos ambientes, incluindo solo, água, esgoto, vegetação e instalações de processamento alimentar (RYSER & MARTH, 2007). A presença desse patógeno é frequentemente descrita em uma variedade de alimentos, incluindo produtos lácteos, alimentos processados e prontos para consumo, carnes , peixes, e vegetais (LINNAN et al., 1988; WING & GREGORY, 2002; GOTTLIEB et al., 2006; LOPEZ-VALLADARES et al., 2014; CAMARGO et al., 2015). *L. monocytogenes* possui a habilidade de se multiplicar em temperaturas entre -0,4 °C a 50 °C e se replicar em concentrações de NaCl relativamente altas (RYAN et al., 2010).

L. monocytogenes é responsável pela listeriose, infecção rara, porém severa, associada com alta mortalidade, de aproximadamente 30%, até mesmo quando terapia antimicrobiana é administrada corretamente (LECUIT, 2007). A dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida, pois pode variar de acordo com a virulência da cepa e susceptibilidade do indivíduo (MCLAUHLIN et al., 2004). Em indivíduos saudáveis, a listeriose manifesta-se como gastroenterite caracterizada por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (JAY et al., 2005). Em mulheres grávidas, listeriose pode causar abortos

espontâneos, natimortos ou morte fetal. Em pacientes imunocomprometidos, listeriose está associada a doenças severas de origem não entérica, tais como meningite e septicemia (DOYLE & BEUCHAT., 2007). Apesar da baixa incidência, um alto custo econômico está associado ao tratamento da listeriose humana, ainda sub diagnosticada na maior parte dos casos (CDC, 2019).

L. monocytogenes pode causar doença por meio da ingestão de alimentos contaminados, possuindo a capacidade de atravessar a barreira intestinal e de se disseminar dos linfonodos mesentéricos para o baço e fígado (LECUIT, 2007). A microbiota intestinal tem papel crucial na resistência contra a colonização de patógenos, e os mecanismos pelos quais

L. monocytogenes compete com essa microbiota ainda estão sendo estudados (QUEREDA et al., 2016).

A primeira escolha de antibiótico para tratamento em pacientes com listeriose é a penicilina, podendo também ser utilizado sulfametoxazol ou trimetropim; a eritromicina é o antibiótico de eleição em pacientes grávidas (JANAKIRAMAN, 2008). O aumento da resistência antimicrobiana em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de animais gera preocupação sobre a disseminação desta resistência em isolados humanos. Isolados de *L. monocytogenes* já foram descritos como sendo resistentes a penicilina, rifamicina, clindamicina, eritromicina e tetraciclina (OBAIDAT et al., 2015; SWAMINATHAN et al., 2007; TROXLER et al., 2000).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que aproximadamente 1.600 pessoas desenvolvam listeriose ao ano (CDC, 2019) e estabelece um limite de tolerância zero para produtos prontos para o consumo que suportam o desenvolvimento de *L. monocytogenes* e limite de tolerância menor que 100 unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) em alimentos que não possibilitem a sua

multiplicação. A União Europeia estabeleceu limites de segurança microbiológicos nos quais é necessário que o número de *L. monocytogenes* permaneça menor que 100 UFC/g de produto durante toda vida de prateleira (EUROPEAN COMMISSION., 2008).

No Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) adotou a ausência em 25 g como padrão microbiológico de *L. monocytogenes* em determinados alimentos. Entretanto, as legislações são bastante controversas, pois especifica a necessidade de pesquisa desse patógeno em alguns alimentos, como alguns tipos de queijos, mas não considera sua pesquisa em outros alimentos usualmente associados a *L. monocytogenes*, como embutidos cárneos (MAPA, 2009).

Vários estudos já identificaram a presença de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento alimentar no Brasil, fato que gera preocupação devido a possibilidade de contaminação dos produtos finais. Camargo et al. (2015) demonstrou que cepas de *Listeria* isoladas nos produtos finais compartilhavam o mesmo perfil molecular de cepas isoladas no ambiente de processamento de carnes na região sudeste do Brasil. Barros et al. (2007) detectou a presença do patógeno em carcaças bovinas, no ambiente de processamento de alimentos e em cortes finais de carne no estado do Paraná. Barancelli et al. (2014) detectou a presença de isolados persistentes de *L. monocytogenes* em queijarias na região do estado de São Paulo, sendo o sorotipo 4b o mais frequentemente identificado.

Nem todas as cepas de *L. monocytogenes* são associadas a listeriose em humanos, e podem ser classificadas em quatro linhagens evolucionárias distintas: I, II, III e IV (WIEDMANN et al., 1997; ORSI et al., 2011). Casos de listeriose em humanos são atribuídos com maior frequência a isolados da linhagem I, que possuem maior virulência, e são capazes de induzir a doença independente da condição imunológica do paciente (MAURY et al., 2016).

Com base nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), *L. monocytogenes* pode ser tipificada em 13 diferentes sorotipos, sendo os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b os mais associados a surtos e infecções humanas (ROCOURT et al., 2000; LIU, 2008). Com a evolução das novas técnicas de sequenciamento genético e o aumento da disponibilidade de sequências genômicas publicadas, já é possível observar a diferença presente na virulência de cepas da mesma espécie de *L. monocytogenes*, o que fornece melhor identificação e tipificação deste patógenos com alta diferenciação dos seus fatores de virulência (BRUL et al., 2012).

2. Fatores de virulência e patogenia da listeriose

Após a ingestão do alimento contaminado, *L. monocytogenes* alcança o intestino, onde irá competir com a microbiota intestinal para sobreviver e colonizar o lúmen intestinal (STAVRU et al., 2011). A barreira epitelial intestinal é uma importante linha de defesa do organismo contra os patógenos entéricos; porém, *L. monocytogenes* possui a capacidade de causar disfunção em locais específicos das microvilosidades intestinais e promover a translocação bacteriana para dentro da célula (DROLIA et al., 2018).

L. monocytogenes desenvolve um ciclo de vida intracelular característico e seu mecanismo de invasão já foi descrito e caracterizado a nível molecular durante os últimos 15 anos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Este ciclo é um fator crítico para a patogênese de *L. monocytogenes*, visto que isolados que não são capazes de infectar as células hospedeiras não são capazes de causar doença (SEVEAU, 2014).

A entrada de *L. monocytogenes* nas células hospedeiras envolve um processo dinâmico que requer a polimerização da actina e remodelamento da membrana citoplasmática, demonstrando a capacidade de manipular as vias de sinalização intracelular, o que promove ampla reorganização do citoesqueleto de actina e culmina com a entrada bacteriana na célula alvo (HAMON et al., 2006). A internalização de *Listeria* se inicia com a interação entre os

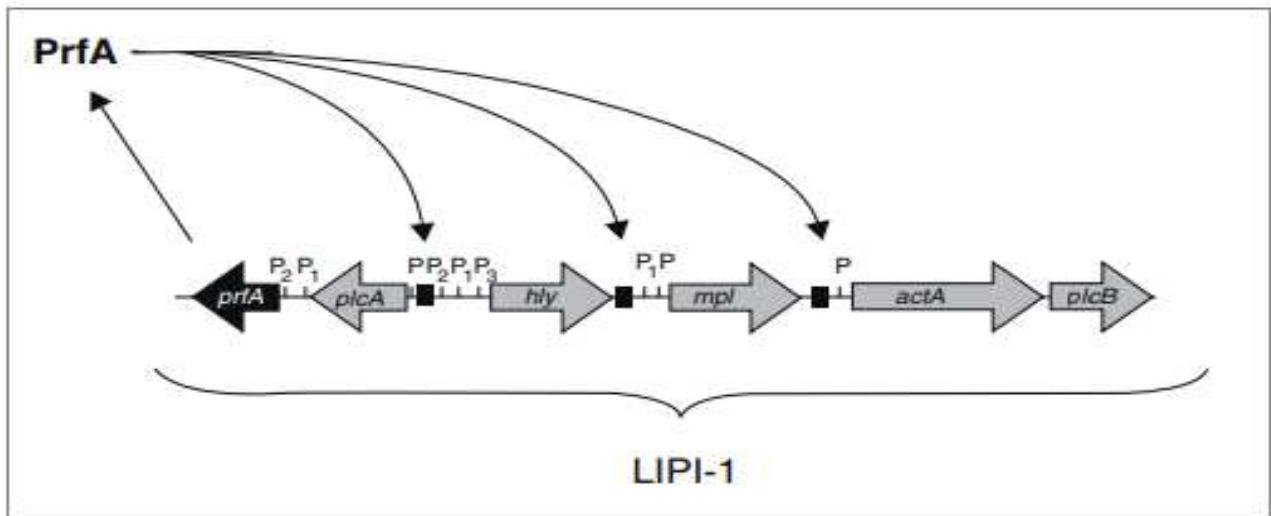
receptores da superfície celular do hospedeiro e uma vez dentro da célula alvo, *L. monocytogenes* pode sobreviver e se multiplicar induzindo alterações morfológicas nas organelas celulares do hospedeiro, o que leva a alteração de suas funções normais e promove a infecção (RADOSHEVICH & COSSART, 2018).

Acredita-se que os fatores de virulência cruciais de *L. monocytogenes* são localizados em sequências conservadas do genoma de diferentes cepas, porém técnicas de sequenciamento completo do genoma já revelaram a existência de códons de parada prematura e mutações ocorrendo nestes genes em diferentes isolados (NIGHTINGALE et al., 2005; NIGHTINGALE et al., 2008). O mecanismo molecular envolvido nas diferenças entre os isolados provenientes de casos clínicos e ambientais pode revelar novos fatores de virulência importantes associados ao mecanismo de patogênese de *L. monocytogenes* (RADOSHEVICH & COSSART, 2018).

2.1. Ilhas de patogenicidade de *L. monocytogenes*

Os genes associados aos fatores de virulência de *Listeria* foram inicialmente identificados em uma mesma região, que possui seis fatores responsáveis pelo parasitismo intracelular, inicialmente denominada de cluster de genes dependente de *hly* ou *prfA* (CHAKRABORTY et al., 1992). Atualmente esta região é denominada de Ilha de Patogenicidade de *Listeria*-1, LIPI-1 e dentro dessa ilha os genes estão organizados da seguinte forma: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB* (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001) (Figura 1).

Figura 1. Ilha de Patogenicidade I de *Listeria monocytogenes* e expressão de genes sob o controle do *ativador transcricional PrfA*.



FONTE: DE LAS HERAS et al., 2011.

O gene *hly* foi o primeiro fator de virulência identificado em *Listeria* e codifica a listeriolisina O (LLO), uma toxina formadora de poros responsável pela característica hemolítica, e que em conjunto com as fosfolipases PlcA e PlcB permitem o escape do fagossomo nas células hospedeiras (MOSTOWY & COSSART, 2012). LLO, PlcA e PlcB foram descobertos décadas atrás, porém novos conceitos em relação às suas características de virulência estão sendo revelados ao longo dos anos (SIBELIUS et al., 1999; VADIA et al., 2011; QUEREDA et al., 2018).

LLO é um fator de virulência essencial de *L. monocytogenes*, e sua inativação pode gerar cepas menos virulentas. Essa toxina encontra-se totalmente ativada quando dentro de ambiente mais ácido ($\text{pH} < 6$) do fagossomo e apresenta menor atividade quando em pH mais básico como no citoplasma da célula hospedeira (HAMON et al., 2006).

Os genes *mpl*, *actA* e *plcB*, encontram-se organizados sob a forma de operon, logo abaixo do gene *hly*. O gene *mpl* codifica uma metaloprotease envolvida na maturação de PlcB. A proteína de superfície ActA codificada pelo gene *actA* está envolvida no processo de polimerização da actina na célula hospedeira, o que permite a motilidade intra e extra celular.

e o gene *plcB* codifica a fosfolipase PlcB (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; COSSART, 2011).

A expressão dos genes da LIPI-1 está sob o controle do *ativador transcricional PrfA*, codificado pelo gene de mesmo nome na ilha, e os seus mecanismos de regulação são vastos e já foram extensivamente estudados, ressaltando a importância como um fator de virulência crucial durante a infecção (LEIMEISTER-WÄCHTER et al., 1990; RENZONI et al., 1999; DE LAS HERAS et al., 2011; RENIERE et al., 2015).

A expressão de *prfA* está sob o comando de um termosensor 5'UTR, que pode adotar estruturas secundárias alternativas dependendo da temperatura detectada no ambiente em que se encontra (COSSART, 2011). Este fator resulta em expressão ótima de *prfA* em altas temperaturas e menor expressão em temperaturas baixas, o que explica como os genes de virulência associados a esse regulador são otimamente expressos a 37 °C (JOHANSSON et al., 2002).

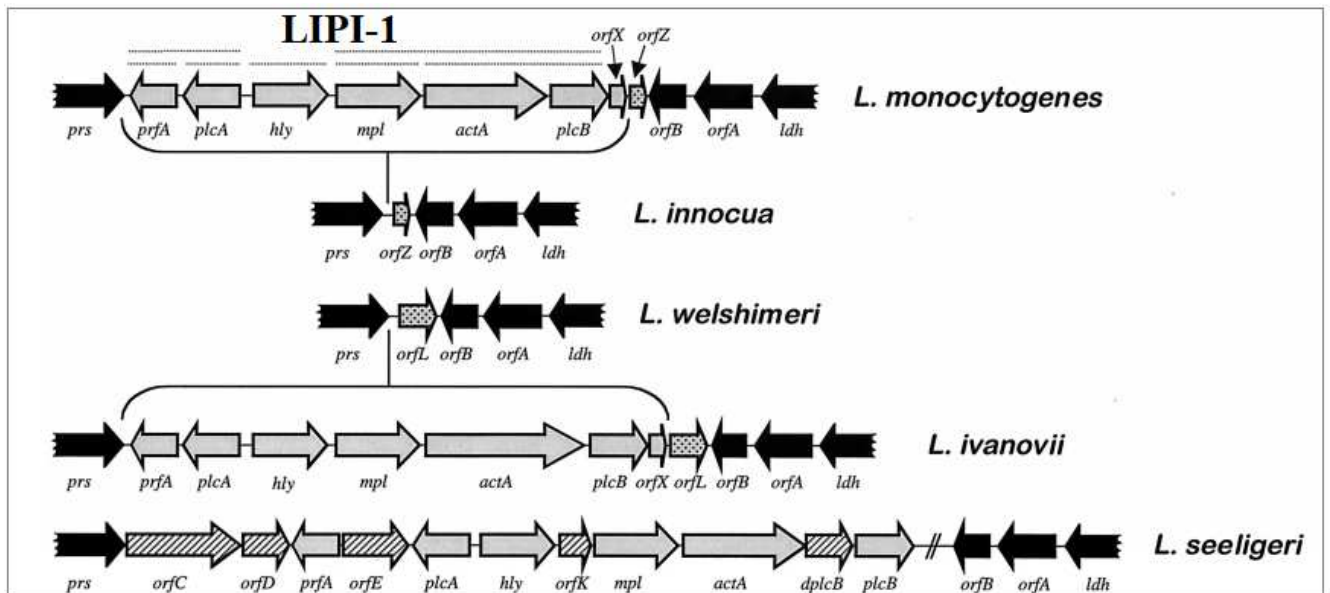
A LIPI-I coordena os fatores relacionados a capacidade de invadir e se multiplicar nas células eucariotas e estas características são diretamente relacionadas com a virulência de *L. monocytogenes* (SANSANO et al., 2017). Mutações no gene *prfA*, são raras porém estão associadas a atenuação da virulência expressa por essas cepas (RUPP et al., 2015). No entanto os genes da LIPI-1 se encontram distribuídos em todos os sorotipos de *L. monocytogenes* o que leva a falsa concepção de que os isolados sejam igualmente virulentos (MAURY et al., 2017; WANG et al., 2018).

Além da sua ampla distribuição dentre os isolados de diversas linhagens de *L. monocytogenes*, a LIPI-1 também já foi identificada em *L. ivanovii*, que apesar de possuir ciclo de vida intracelular similar ao de *L. monocytogenes*, raramente é associada a doença em humanos. LIPI-I é ausente em genomas de *Listeria* spp não patogênicas, com uma exceção: *L. seeligeri*, que possui os genes intactos estruturalmente, porém não funcionais devido a

inserção de genes divergentes entre os genes *plcA* e *prfA*, o que leva a regulação inadequada dos fatores de virulência (GOEBEL et al., 1999; VÁZQUEZ-BOLAND et al. 2001) (Figura 2).

Outros fatores de virulência de *L. monocytogenes* já foram identificados e estudados, sugerindo que os processos envolvidos na patogenicidade, como a capacidade de aderência a célula hospedeira e o complexo processo de invasão celular, são coordenados de maneira multifatorial (AUTRET et al., 2001). Embora os genes correlacionados a LIPI-1 tenham sido extensivamente estudados ao longo das últimas décadas, o resultado desses estudos falhou em correlacionar adequadamente a virulência de isolados provenientes de alimentos e a chance de tais isolados causarem doença em humanos (KATHARIOU, 2002).

Figura 2. Organização física e transcricional da ilha de patogenicidade I de *Listeria*



monocytogenes e estrutura do cluster de genes em outras espécies de *Listeria* spp.

FONTE: VÁZQUEZ-BOLAND et al. 2001.

Além da LIPI-1, uma segunda Ilha de Patogenicidade de *Listeria* já foi descrita, a LIPI-2, que possui um grupo de genes responsáveis pela codificação de *sphingomyelinase C*; acredita-se que a LIPI-2 seja específica de *L. ivanovii* e que possua papel crucial no tropismo deste patógeno por ruminantes (GONZÁLEZ-ZORN et al., 2000).

A identificação dos novos fatores de virulência em *L. monocytogenes* é complexa, mas seu estudo é necessário visto que pode contribuir na compreensão da diferença de patogenicidade, assim como na prevenção e controle da listeriose (LIU, 2006; ORSI et al., 2011). Atualmente já foi revelado que isolados de origem epidêmica de *L. monocytogenes* podem possuir três ilhas de patogenicidade distintas, LIPI-1, LIPI-3 e LIPI-4 (MAURY et al., 2016). Embora a estrutura e diversidade desses fatores de virulência sejam amplamente estudados em diversos países, dados deste patógeno que envolvem sua diversidade epidemiológica no Brasil são escassos (CAMARGO et al., 2017; CAMARGO et al., 2019).

3. Ilha de patogenicidade-3 (LIPI-3)

A patogenicidade de cepas de *Listeria monocytogenes* foi estudada por décadas baseando-se em cepas pertencentes a linhagem evolucionária II, que inclui a cepa referência EGDe. Porém, sabe-se que vários dos surtos de listeriose são associados a cepas do sorotipo 4b, pertencentes a linhagem I, que haviam sido pobremente caracterizadas em relação aos seus mecanismos moleculares que poderiam influenciar sua maior virulência (KATHARIOU, 2002; MAURY et al., 2017).

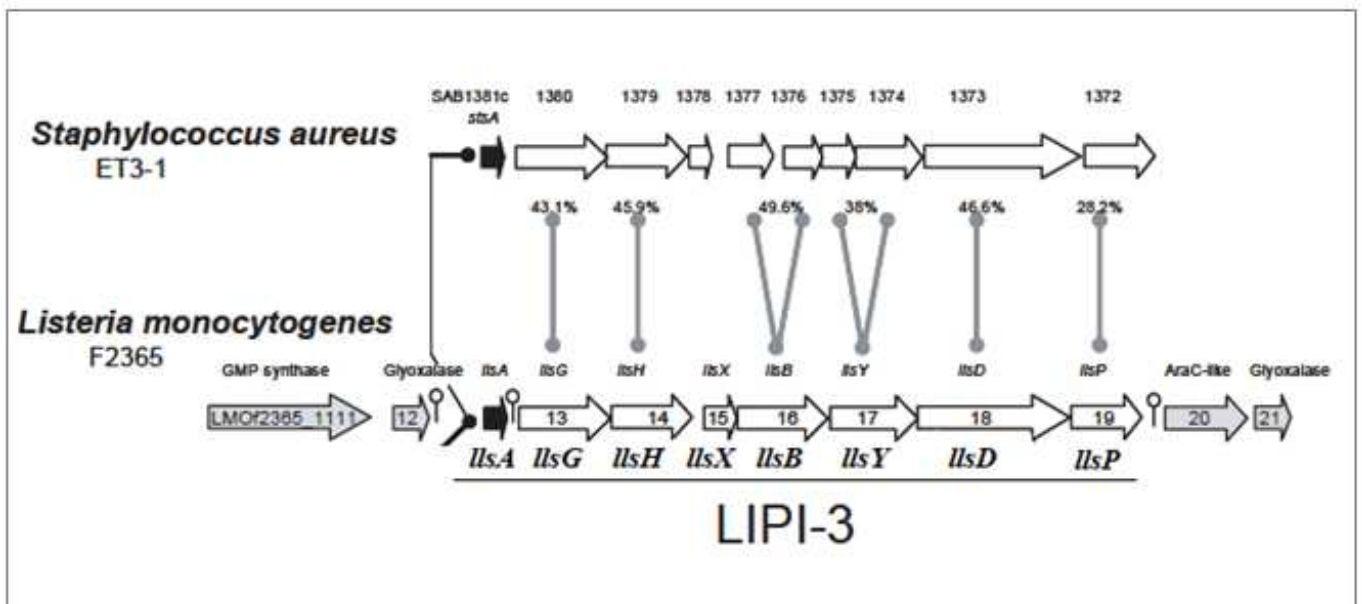
Ao estudar cepas da linhagem I, Lee et al. (2008), revelaram a presença de um novo grupo de genes conservados, que se assemelha estruturalmente ao grupo de genes que codifica a Streptolisina S (SLS), um fator de virulência citotóxico e hemolítico que possui papel determinante em cepas de *Streptococcus* (grupo A). A distribuição deste grupo de genes em

cepas da linhagem I de *L. monocytogenes* responsáveis por maior parte dos surtos indica que este fator hemolítico possui relevância na sua virulência.

Este novo cluster de genes foi denominado Ilha de Patogenicidade de Listeria 3 (LIPI-3) e foi demonstrada a capacidade de codificar precursores para a produção e maturação de uma toxina, que age de maneira similar a descrita em estudos prévios pela bacteriocina microcina B17. Essa nova toxina foi denominada Listeriolisina S (LLS) e codifica fatores hemolíticos e citotóxicos necessários para a virulência *in vivo* (COTTER et al., 2008).

O cluster de genes associado a produção de Listeriolisina S é variável, tendo sido identificado inicialmente apenas em algumas cepas da linhagem I (Figura 3). LLS é codificada pelo gene estrutural *llsA* presente na LIPI-3 que também codifica os genes *llsX*, *llsG*, *llsH*, *llsB*, *llsY*, *llsD* e *llsP* (COTTER et al., 2008).

Figura 3. Comparação dos operons de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* associados à codificação dos peptídeos de virulência modificados, identificação dos oito genes presentes na ilha de patogenicidade-3 (*llsAGHXBYDP*).



FONTE: COTTER et al., 2008.

Os genes *llsG* e *llsH* codificam transportadores do tipo ABC potencialmente responsáveis pelo transporte de LLS. Os genes *llsB*, *llsY* e *llsD* codificam proteínas, descritas por serem fundamentais na maturação do peptídeo final de LLS, e *llsP* codifica uma protease responsável pelo fator de imunidade à toxina (COTTER et al., 2008; CLAYTON et al., 2011). O gene *llsX* codifica uma proteína de função desconhecida; entretanto, é o único dos 8 genes a possuir especificidade apenas com cepas de *Listeria*, visto que nenhum homólogo deste gene é encontrado em outras bactérias (CLAYTON et al., 2011).

A expressão da LLS é detectada quando *L. monocytogenes* alcança o intestino, sendo responsável pela redução do número de bactérias do gênero *Allobaculum* e *Alloprevotella* e, como consequência, a microbiota do hospedeiro é alterada. Esses gêneros possuem espécies com capacidade de produzir ácido acético e butírico respectivamente. Estes ácidos impactam negativamente a habilidade de multiplicação e de colonização de *Listeria*, sendo assim a expressão de LLS no intestino representa papel importante à sobrevivência de *L. monocytogenes* no organismo (QUEREDA et al., 2016, 2017a). Como bacteriocina, a LLS possui a capacidade de restringir a multiplicação de bactérias proximalmente relacionadas (Gram positivas), como: *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, e até mesmo outras *L. monocytogenes* da linhagem II que não possuam a LIPI-3 (QUEREDA et al., 2017b).

Quereda et al. (2016) relataram deficiência na expressão de LLS *in vitro* e não conseguiram reproduzir os resultados obtidos no estudo de Cotter et al. (2008) que relataram a indução da expressão por meio da exposição a peróxido de hidrogênio e peróxido de cumeno. No entanto, conseguiram observar a expressão de LLS no intestino de ratos infectados, sugerindo que o gene *llsA* seja apenas ativo durante a infecção.

A recente descoberta da LLS e sua atividade bimodal em membranas eucarióticas e procarióticas abrem novas perspectivas sobre a virulência e distribuição ambiental das cepas de *L. monocytogenes*, assim como a existência de uma possível cooperação entre estes novos

fatores de virulência recentemente descobertos (RADOSHEVICH & COSSART, 2018; QUEREDA et al., 2018).

4. Técnicas moleculares na caracterização de fatores de virulência

As análises microbiológicas são adotadas para estimar os riscos de micro-organismos patogênicos relevantes presentes em alimentos, e são utilizadas para o isolamento inicial e identificação de *Listeria* spp. (HITCHINS, 2003). Porém devido a diversidade de espécies de *Listeria* descritas nos últimos anos e as características distintas dos isolados, a utilização de métodos moleculares é necessária para o estabelecimento correto da filogenia e atribuição correta da espécie (GASANOV et al., 2005; LIU, 2006).

As metodologias microbiológicas convencionais não levam em conta a especificidade dos fatores de virulência e não são capazes de esclarecer os mecanismos fisiológicos e moleculares envolvidos na doença (LIU, 2006). Os dados de subtipagem e patogênese disponíveis por esses métodos não fornecem uma visão adequada sobre a variação da virulência dos isolados de *L. monocytogenes* (KATHARIOU, 2002)

Devido a ampla ocorrência de *L. monocytogenes* e sua associação em surtos de origem alimentar, é necessário que na identificação dos isolados sejam estabelecidas associações epidemiológicas que sejam capazes de explicar os mecanismos envolvidos na prevalência dos sorotipos envolvidos (WIEDMANN et al., 2002). Neste contexto, os métodos moleculares de tipificação podem ser utilizados para a caracterização filogenética e para identificar fatores de virulência potencialmente relacionados a espécies distintas de maneira mais rápida e precisa (LIU, 2006; DOUMITH et al., 2004).

A técnica molecular de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE: pulsed gel field electrophoresis) é considerada o padrão ouro dentre as técnicas moleculares por possuir alto poder discriminatório e por ser largamente empregada em diversos países de maneira

padronizada (GRAVES & SWAMINATHAN, 2001). Essa técnica é utilizada atualmente para a subtipificação de *Listeria* e confirmação dos surtos de listeriose (BERGHOLZ et al., 2015). Embora a técnica de PFGE tenha papel importante na investigação de surtos de listeriose e no monitoramento do patógeno, não representa vantagem em relação a acurácia e tempo de resposta quando comparada com técnicas mais recentes (NYARKO et al., 2015).

A técnica de Multilocus Sequence Typing (MLST) pode ser utilizada para subdividir os isolados de uma mesma espécie baseando-se na variação de sequências em múltiplos loci de genes, a partir do seu tipo de sequência (ST) ou complexo clonal (CC). *Listeria* possui 7 genes conservados, denominados “housekeeping” genes, que fornecem informações relevantes e mais padronizadas acerca do seus genótipos e nomenclaturas (MOURA et al., 2016).

O sequenciamento completo do genoma (WGS: whole genome sequencing) pode fornecer caracterização mais detalhada dos patógenos alimentares; o genoma de diversas espécies, incluindo *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Campylobacter* e *Vibrio*, já fornecem grandes avanços na estrutura genética destes patógenos, sendo possível a utilização em aplicações como detecção e rastreamento de surtos de origem alimentar, detalhamento do perfil de virulência e atributos patogênicos, monitoramento da resistência antimicrobiana, segurança da qualidade microbiana e na determinação da causa raiz de eventos contaminantes em alimentos (ALLARD et al., 2018)

A utilização de WGS na detecção e investigação de surtos de origem alimentar já está sendo adotada por agências de saúde pública internacionais, promovendo informações genéticas mais precisas e facilitando a identificação correta das fontes e rotas de contaminação (CDC., 2015). A quantidade de dados disponíveis de genomas completos sequenciados aumentou exponencialmente nos últimos anos, por isso foi desenvolvida uma

plataforma on-line que permite rápido acesso a uma ampla base de dados relevantes de *Listeria* no âmbito das ciências ômicas (BECAVIN et al., 2017).

Com o avanço das tecnologias de sequenciamento de DNA, houve um aprofundamento do entendimento da diversificação dos genomas, o que permite o melhor estudo das variações da diversificação que ocorre nas espécies com o passar do tempo (KUMAR, 2005). O uso de WGS como ferramenta epidemiológica facilita o monitoramento dos isolados de *L. monocytogenes* e o acesso a relações filogenéticas mais confiáveis, o que facilitará a investigação de surtos de origem alimentar, com maior poder discriminatório sobre suas origens (KWONG et al., 2016; BRUL et al., 2012).

Assim, verifica-se a necessidade de intensificar e aprofundar os estudos da variação genômica das cepas *L. monocytogenes*, para uma compreensão mais ampla dos mecanismos de virulência em amostras ambientais e clínicas no Brasil.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1. JUSTIFICATIVA

A presença da ilha de patogenicidade 3 (LIPI-3), que possui a capacidade de codificar a Listeriolisina S, em diversas cepas das linhagens mais associadas aos casos clínicos demonstra a heterogeneidade das cepas de *Listeria monocytogenes* em relação aos seus mecanismos de virulência. Por esta razão o entendimento da função e da variação dos genes presentes na LIPI-3 é de fundamental importância para compreensão dos mecanismos pelos quais

L. monocytogenes é capaz de regular a microbiota intestinal e favorecer a infecção *in vivo*.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar a ilha de patogenicidade 3 (LIPI-3) em isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de cadeias de processamento de alimentar, carnes cruas coletadas em abatedouros bovinos e isolados clínicos pertencentes a coleção de isolados do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações ou deleções genéticas no genoma sequenciado dos isolados que possuam a LIPI-3;
- Analisar o perfil das proteínas de Listeriolisina S (LLS) codificadas pelo gene *llsa* nos diferentes isolados do estudo;
- Identificar a expressão do gene *llsX*, presente na LIPI-3, em diferentes condições de estresse ácido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLARD M. W. et al. Genomics of foodborne pathogens for microbial food safety. **Current Opinion in Biotechnology**. v.49, p.224–229, 2018.

AUTRET, N. et al. Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged transposon mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 4, p. 2054–2065, 2001.

BARANCELLI, G. V. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.173, p.21–29, 2014.

BARROS M.A., NERO L.A., SILVA L.C., et al. *Listeria monocytogenes*: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**.; v.76, p.591–596, 2007.

BECAVIN, C. et al. Listeriomics: an interactive web platform for systems biology of *Listeria*. **mSystems**. v. 2, p. 2. e00186-16, 2017.

BERGHOLZ, T. M. et al. Determination of evolutionary relationships of outbreak-associated *listeria monocytogenes* strains of serotypes 1/2a and 1/2b by whole-genome sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**. v.20; 82(3), p.928-938, 2015.

BRUL, S., BASSETT, J., COOK, P., et al. ‘Omics’ technologies in quantitative microbial risk assessment. **Trends in Food Science & Technology**, v. 27, p.12–24, 2012.

CAMARGO, A.C., CASTILHO, N.P.A., SILVA, D.A.L., et al. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, p. 458-462, 2015.

CAMARGO, A. C., WOODWARD, J. J., CALL, D. R., & NERO, L. A. *Listeria monocytogenes* in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.14(11), p.623–636, 2017.

CAMARGO, A. C., MOURA, A., AVILLAN, J., HERMAN, N., MCFARLAND, A. P., SREEVATSAN, S., CALL, D. R., WOODWARD, J. J., LECUIT, M., NERO, L. A., Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil. **Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports**. In press.

CDC. Advanced molecular detection and response to infectious disease outbreaks (amd) initiative fosters scientific innovation to transform public health and protect people from disease threats. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., 2015.

CDC. The *Listeria* initiative. Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services. Disponível em <<https://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>> acesso em: 20 de Maio de 2019.

CHAKRABORTY, T. et al. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the prfA gene. **Journal of Bacteriology**, v.174(2): p. 568-574, 1992.

CLAYTON, E. M. et al. Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S-positive and -negative strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 163–171, 2011.

COSSART, P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19484–19491, 2011.

COTTER, P. D. et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000144, 2008.

DE LAS HERAS, A. et al. Regulation of *Listeria* virulence: *PrfA* master and commander. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 118–127, 2011.

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

DOYLE M.P. & BEUCHAT, L.R. **Food microbiology : fundamentals and frontiers**. 3rd ed. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2007.

DROLIA, R. et al. *Listeria* adhesion protein induces intestinal epithelial barrier dysfunction for bacterial translocation. **Cell Host & Microbes**, v. 23, n. 4, p. 470- 484.e7, 2018.

EUROPEAN COMMISSION. Guidance Document on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs commission staff. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf>. Acesso em: 3 junho de 2019.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the prokaryotes bergey's manual of systematic bacteriology**. Second edition, 2004.

GASANOV. U., HUGHES D., HANSBRO P. M., Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review, **FEMS Microbiology Reviews**, v 29, Issue 5, p. 851–875, 2005.

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

GOEBEL, W.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.-A.; EVANG, J. K. Virulence gene clusters and putative pathogenicity islands in *Listeria*. in: pathogenicity islands and other mobile virulence elements. [s.l.] **American Society of Microbiology**, p. 219–232, 1999.

GOTTLIEB, S. L. et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in us regulatory policy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 1, p. 29–36, 2006.

GRAVES, L. M. & SWAMINATHAN, B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1–2, p. 55–62, 2001.

HITCHINS, A. D. Bacteriological analytical manual, chapter 10. Food and Drug Administration. 2003. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-10.html>. Acesso em: 3 junho de 2019.

JANAKIRAMAN, V. Listeriosis in pregnancy: diagnosis, treatment, and prevention. **Reviews in Obstetrics & Gynecology**, v. 1, n. 4, p. 179–185, 2008.

JAY, J. M. ; JAMES M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. [s.l.] Springer, 2005.

JOHANSSON, J. et al. An RNA Thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 551–561, 2002.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 11, p. 1811–29, 2002.

KUMAR, S. Molecular clocks: four decades of evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 654–662, 2005.

KWONG, J. C. et al. Prospective Whole-Genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 333–342, 2016.

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

LEE, S. W. et al. Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5879–5884, 2008.

LINNAN, M. J. et al. Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 13, p. 823–828, 1988.

LIU, D. **Handbook of *Listeria monocytogenes***. [s.l.] Taylor & Francis, 2008.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645–659, 2006.

LOPEZ-VALLADARES, G. et al. Human isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden during half a century (1958–2010). **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 11, p. 2251–2260, 2014.

MAPA. Instrução Normativa n. 9, de 8 de abril de 2009. Institui os procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal. Diário Oficial da União, 2009.

MAURY, M. M. et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 308–313, 2016.

MAURY, M. M. et al. Spontaneous loss of virulence in natural populations of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 11, e00541-17, 2017.

MCLAUCHLIN, J., MITCHELL, R.T., SMERDON, W.J., JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**. 92, 15–33, 2004.

MOSTOWY, S. & COSSART, P. Virulence factors that modulate the cell biology of *listeria* infection and the host response. **Advances in Immunology**, v. 113, p. 19–32, 2012.

MOURA, A. et al. Whole genome-based population biology and epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 16185, 2016.

NIGHTINGALE, K. K. et al. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8764–8772, 2005.

NIGHTINGALE, K.K et al. *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, p. 6570–6583. 2008.

NYARKO, E. B.; DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: Strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2868–M2878, 2015.

OBAIDAT, M. M. et al. Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 609–614, 2015.

ORSI, R.H., BAKKER, H.C.D., AND WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, p.79-96, 2011.

ORSI, R. H.; WIEDMANN, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 12, p. 5273–5287, 2016.

QUEREDA, J. J. et al. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 20, p. 5706–5711, 2016.

QUEREDA, J. J. et al. Listeriolysin S is a Streptolysin S-Like virulence factor that targets exclusively prokaryotic cells *in vivo*. **mBio**, v. 8, n. 2, e00259-17, 2017a.

QUEREDA, J. J. et al. Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. **Gut Microbes**, v. 8, n. 4, p. 384-391, 2017b.

QUEREDA, J. J. et al. Role in virulence of phospholipases, listeriolysin O and listeriolysin S from epidemic *Listeria monocytogenes* using the chicken embryo infection model. **Veterinary Research**, v. 49, n. 1, p. 13, 2018.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–46, 2018.

RENIERE, M. L. et al. Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. **Nature**, v. 517, n. 7533, p. 170–173, 2015.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 197–209, 20 dez. 2000.

ROCOURT J & BUCHRIESER C. **The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification**. In: Ryser ET & Marth EH Ed (s). *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Broken Sound Parkway NW: CRC Press, 1-20, 2007.

RUPP, S. et al. A naturally occurring prfA truncation in a *Listeria monocytogenes* field strain contributes to reduced replication and cell-to-cell spread. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1–2, p. 91–101, 2015.

RYAN, S. et al. A five-gene stress survival islet (SSI-1) that contributes to the growth of *Listeria monocytogenes* in suboptimal conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 984–995, 2010.

RYSER, E. & MARTH, E. (EDS.). *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition. [s.l.] CRC Press Taylor and Francis Group, 2007.

SANSANO, S. et al. Stevia rebaudiana Bertoni effect on the hemolytic potential of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 250, p. 7–11, 2017.

SEVEAU, S. et al., .Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria monocytogenes*. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 80, p. 161–195, 2014.

SIBELIUS, U. et al. Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1125–1130, 1999.

STAVRU, F.; ARCHAMBAUD, C.; COSSART, P. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 160–184, 2011.

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

TROXLER, R. et al. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 10, p. 525–535, 2000.

VADIA, S. et al. The Pore-forming toxin listeriolysin o mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002356, 2011.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 571–584, 2001.

WANG, H. et al. Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 104–112, 2018.

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

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

WING, E. J. & GREGORY, S. H. *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 9, p. 18-24, 2002.

CAPÍTULO 2

SCIENTIFIC ARTICLE. *Listeria monocytogenes*: Pathogenic island 3 characterization and *llsX* expression in different stress conditions.

RAFAELA DE MELO TAVARES

ABSTRACT

TAVARES, Rafaela de Melo, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2019. ***Listeria monocytogenes*: Pathogenic island 3 characterization and *llsX* expression in different stress conditions.** Adviser: Luís Augusto Nero. Co-adviser: Ricardo Seiti Yamatogi.

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that can cause disease in humans and due to its ubiquitous characteristic represents an important public health concern. The distribution of virulence factors in *L. monocytogenes* is highly heterogeneous and predominantly present in lineage I strains serotypes. The presence of *L. monocytogenes* Pathogenicity Island 3 (LIPI-3) it is associated with a higher virulence in some strains, since this island encodes for Listeriolysin S (LLS), a virulence factor necessary for the survival of the pathogen *in vivo*. The main purpose of this study was to detect LIPI-3 genes in *L. monocytogenes* strains and to carry out comparative analyzes between LIPI-3 positive strains, in order to establish an association with phenotypic tests for LIPI-3 expression *in vitro*. Homologues of the eight LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) were identified in 43% of the 35 screened isolates, with single nucleotide polymorphism (SNP) and mutation profile lower in ST1(4b) and ST3 (1/2b) isolates when compared to ST288 (1/2b) and ST218 (4b). The lower genetic variability of LIPI-3 was observed in clinical isolates (4b), when compared to isolates from food (1/2b), highlighting the importance of LIPI-3 as a virulence factor. *llsX* gene was highly conserved in all isolates from different STs in this study, however the variation of (SNPs) between the different serotypes revealed the alteration of the final peptide obtained (LLS) in isolates ST218 (4b) and 288 (1/2b), which may result in lower virulence potential of these strains. Based on the results obtained in the LIPI-3, three distinct isolates were selected for expression evaluation of the *llsX* gene *in vitro* under different acid stress conditions; the results obtained in this step revealed significant differences in gene expression. Although the *llsX* expression was observed for the two serotypes 4b and 1/2a, *llsX* expression after six hours of acid stress was only observed in isolate 4b. Altogether, the findings highlights the importance of LIPI-3 genomic variation among different LIPI-3 positive isolates, which may lead to a better explanation of virulence difference between *L. monocytogenes* strains of the same serotype, and to a better understand of LLS as virulence factor.

Key words: Listeriosis, virulence, LIPI-3, Listeriolysin S.

1. INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a Gram-positive bacterium that causes a wide spectrum of illness through the consumption of contaminated food products (SWAMINATHAN et al., 2007). Due to its ubiquitous nature and ability to survive under such significant environmental stresses, *L. monocytogenes* is considered an important foodborne pathogen (LIU et al., 2008). Despite being sporadic, listeriosis is associated to a high mortality rate, specially to high-risk groups such as elderly people, pregnant woman and immunocompromised patients (LECUIT, 2007). Listeriosis is ranked in the third place for leading cause of death among foodborne illness in the USA according to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2019).

A variety of genotyping methods have been used to differentiate *L. monocytogenes* isolates into four different lineages (I, II, III, IV) with highly heterogeneous virulence factors with regards to its pathogenicity (ORSI et al., 2011; MAURY et al., 2016). Surveillance of *L. monocytogenes* involves the use of subtyping methods, and their reliability are crucial for time tracking and identification of the pathogen during foodborne disease outbreak investigations. Serotyping was the first method developed and it is still used to characterize *L. monocytogenes* isolates during epidemiological investigation (ORSI et al., 2011; NYARKO & DONNELLY, 2015). Based on somatic and flagellar antigens, *L. monocytogenes* can be classified into 13 different serotypes, although *L. monocytogenes* are regarded as equally virulent by regulatory authorities, strains from serotype 4b, lineage I, are more frequently isolated from clinical cases than the other serotypes, being more isolated from foods (DOUMITH et al., 2004; ORSI et al., 2011; MAURY et al., 2016). Whole genome sequencing (WGS) can be used to group *L. monocytogenes* isolates based on their phylogenetic lineage, with the advantage of a more accurate subtyping analysis when compared to other molecular methods, providing substantial information of specific virulence

genes in *L. monocytogenes* (WU et al., 2016). This information can be valuable for risk assessments associated with *L. monocytogenes* contamination, reducing future risks for the consumers (SMITH et al., 2018).

Based on the novel molecular methodologies employed to characterize foodborne pathogens, as WGS, it was possible to discover and characterize novel virulence factors in *L. monocytogenes* strains associated to human listeriosis, highlighting the importance of the phylogenetic analysis of the isolates (QUEREDA et al., 2017). *L. monocytogenes* pathogenicity island 3 (LIPI-3) was first discovered in a subset of lineage I strains, and encodes a biosynthetic cluster involved in the production of Listeriolysin S (LLS), a hemolytic and cytotoxic factor that is shown to be required for *L. monocytogenes* virulence *in vivo* (COTTER et al., 2008; QUEREDA., 2016).

Therefore, the main purpose of this study was to identify and characterize LIPI-3, responsible for encoding Listeriolysin S, in *Listeria monocytogenes* strains isolated from food processing chain, raw meats collected from bovine slaughterhouses and strains from clinical isolates in Brazil, assessing the genomic variation of the sequenced isolates.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Isolates selection for genomic analyses

A collection of 35 *L. monocytogenes* Brazilian isolates were obtained from the Food Inspection Laboratory Collection (Federal University of Viçosa), most of them provided by FIOCRUZ, were previously characterized (CAMARGO et al.,2015; CAMARGO et al., 2016). These isolates were screened for the presence of LIPI-3. Table 1 list the panel of *Listeria* strains used in this study, describing identification of the isolate (ID), source of isolation (Clinical, food and environment), year of isolation (from 1978 to 2013), lineages (I and II), MLST classification and the serotypes distribution (1/2b, 4b, 1/2a, 1/2c). Pure cultures were maintained at -20 °C in brain heart infusion (BHI) broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) in the presence of 20% (v/v) glycerol (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). All strains were cultured at 37 °C for 16 h in BHI broth prior to use unless otherwise stated.

Table 1. *Listeria monocytogenes* isolates screened for LIPI-3 genes.

ID	SOURCE	LINEAGE	MLST	SEROTYPE
CLIST 2083	Clinical, 2008	I	SL3	1/2b
CLIST 2138	Clinical, 1982	I	SL3	1/2b
7	Food, 2009	I	SL3	1/2b
CLIST 441	Food, 2010	I	SL3	1/2b
CLIST 3865	Food, 2002	I	SL3	1/2b
CLIST 3869	Food, 2004	I	SL3	1/2b
CLIST 3870	Food, 2004	I	SL288	1/2b
CLIST 1011	Clinical, 1985	I	SL1	4b
CLIST 1015	Clinical, 1985	I	SL1	4b
CLIST 2167	Clinical, 1997	I	SL315	4b
CLIST 2168	Clinical, 2007	I	SL218	4b
CLIST 2930	Clinical, 2004	I	SL218	4b
CLIST 3723	Clinical, 1990	I	SL2	4b
CLIST 3734	Clinical, 1989	I	SL218	4b
CLIST 3735	Clinical, 1985	I	SL1	4b
CLIST 3739	Clinical, 2000	I	SL2	4b
233	Environment, 2012	I	SL2	4b

1282	Environment, 2013	I	SL218	4b
CLIST 3729	Environment, 1991	I	SL2	4b
74	Food, 2010	I	SL218	4b
CLIST 3192	Food, 2006	I	SL315	4b
CLIST 3724	Food, 2003	I	SL2	4b
CLIST 2137	Clinical, 1983	II	SL9	1/2a
CLIST 2140	Clinical, 1978	II	SL7	1/2a
CLIST 3732	Clinical, 1989	II	SL9	1/2a
CLIST 732	Food, 2009	II	SL8	1/2a
CLIST 3186	Food, 2006	II	SL9	1/2a
CLIST 3726	Food, 2003	II	SL9	1/2a
CLIST 3864	Food, 2002	II	SL121	1/2a
19	Environment, 2009	II	SL9	1/2c
227	Environment, 2010	II	SL9	1/2c
45	Food, 2010	II	SL9	1/2c
508	Food, 2012	II	SL9	1/2c
581	Food, 2012	II	SL9	1/2c
CLIST 3727	Food, 2003	II	SL8	1/2c

2.2. Comparative analysis of LIPI-3

The WGS data from the Brazilian isolates were obtained by Illumina MiSeq platform (CAMARGO et al., 2019). The genome of the strain F2365 (NC_002973) was used as reference strain in this study, once it was the first one described as harboring LIPI-3 (COTTER et al., 2008), and to obtain the individual genes of the LIPI-3 (*llsa, llx, llsg, llsh, llsb, llsy, llsd, llsp*) as well as the genes *lmof2365_1111* and *lmof2365_112* that surround the island.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified mapping the position of each individual gene to the genome of strain F2365 and the effect of the deduced protein was generated after the location of the SNP. All genes and predicted proteins from the *L. monocytogenes* genomes were aligned using clustalW, Muscle and BLAST (Genious Prime 2019.2.1).

2.3. Evaluation of growth in different acid stress conditions

A total of 15 *L. monocytogenes* strains that presented LIPI-3 genes on the previous screening for the island were chosen, as well as the strain F2365 (NC_002973) to evaluate growth in different acid stress conditions. Cells were grown in BHI broth 37 °C until an optical density (OD) at 600 nm of 0.4. The cultures were divided into several portions and harvested by centrifugation at 4 °C for 10 min at 3000 g, and the bacterial pellet resuspended in five different conditions for each isolated: BHI pH 7.5 (standard condition), BHI pH 3.5, BHI pH 4.5, BHI pH 5.5, BHI pH 6.5. pH was adjusted with HCl 1M for the acid stress conditions, followed by a 6 h incubation at 37 °C. For the evaluation of viability and survival of *L. monocytogenes* to the different acid stress conditions, the OD was monitored during the incubation time, in time intervals of 0, 2, 4, and 6 h (Bel Analytical Equipment LTDA, Piracicaba, SP, Brazil).

2.4. Gene expression analysis of LIPI-3

Considering the results obtained in the previous step with the 16 isolates and the LIPI-3 comparative analysis of the isolates, three isolates were selected for the gene expression analysis: F2365 (NC_002973), CLIST 441 and CLIST 3870. The three isolates were grown in BHI broth 37 °C, the cell density of each strain was adjusted to OD₆₀₀ of 0.4, the cultures were divided into 3 portions and harvested by centrifugation at 4 °C for 10 min at 3000 g, and the bacterial pellet resuspended in 3 different conditions: BHI pH 7.5 (standard condition), BHI pH 3.5 and BHI pH 4.5. pH was adjusted with HCl 1M for the acid stress conditions, followed by 6 h incubation at 37 °C. At times 0, 2, 4, and 6 h, aliquots of each cultures were obtained for optical density measuring at 600nm (Bel Analytical Equipment LTDA, Piracicaba, SP, Brazil) and ten-fold dilution in NaCl 0.85% (w/v) for surface plating in BHI agar and incubation at 37 °C for 24 h, when the colonies were enumerated and the results

expressed in colony forming units per mL (CFU/mL). Also, aliquots of 1.5 mL were subjected to RNA extraction. The RNA was extracted from two independent experiments (Figure 1).

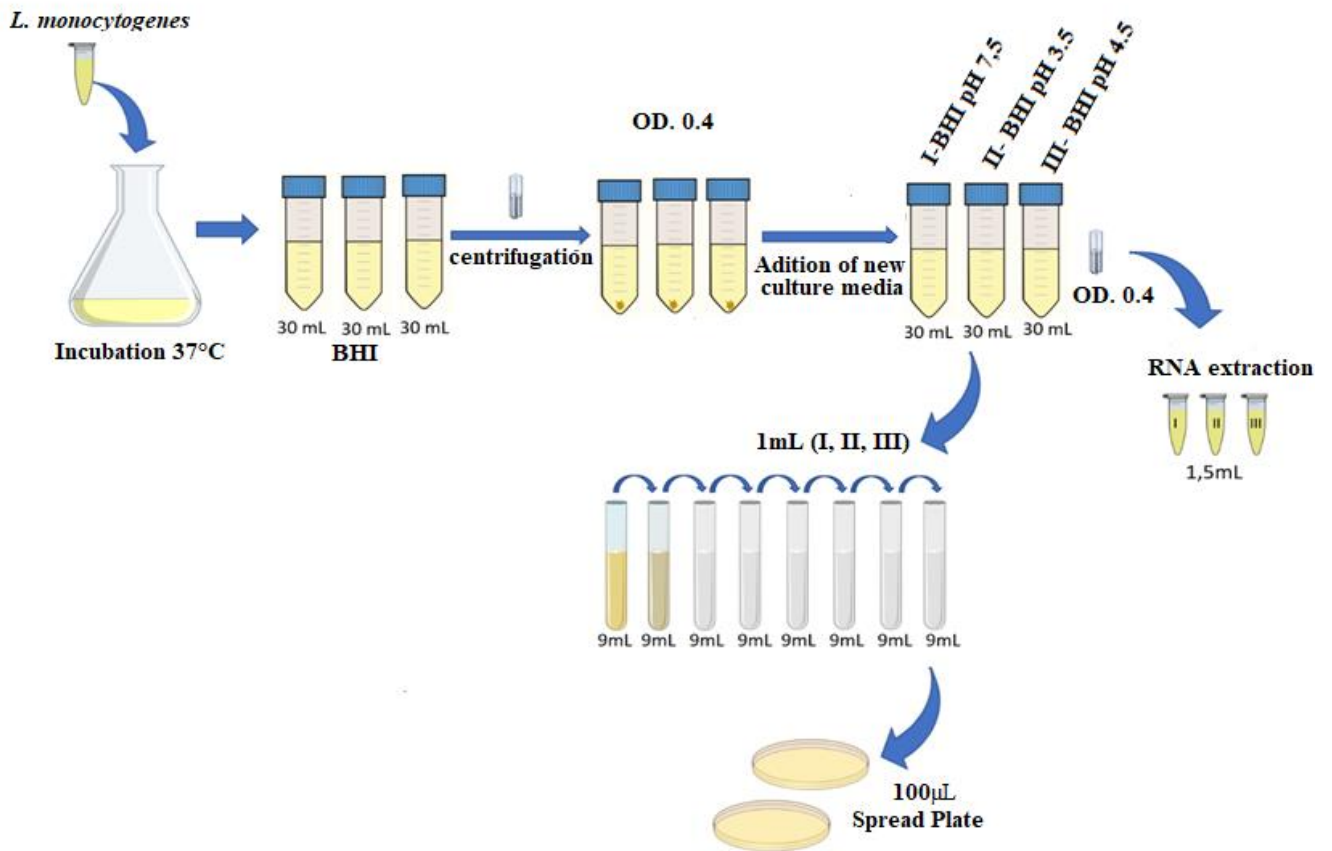


Figure 1. Flowchart of the experiment for expression of LIPI-3 virulence gene in response to different acid stress conditions.

2.4.1. RNA extraction

L. monocytogenes cells prepared under the different experimental conditions of acid stress models described above were harvested by centrifugation (8000 g for 10 min). The pellet cells were used to extract the total RNA, the bacterial cells were disrupted enzymatically, thereafter total RNA was isolated from the bacterial cell lysates following the

RNeasy Mini Kit protocol (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA eluted was submitted to DNase treatment with RQ1 RNase-Free DNase kit (Promega Corp., Madison, WI, USA) prior to the cDNA synthesis to ensure the removal of any residual DNA. The reverse transcription (RT) of the treated RNA was performed using the GoScript™ Reverse Transcription kit (Promega) according to the manufacturer's protocol, the cDNA obtained was stored at -20 until needed. The two independent biological replicates were prepared and treated separately.

2.4.2. Real-time reverse transcription PCR (RT-qPCR)

The cDNA obtained was used to perform the RT-qPCR to identify the expression of *llsX* gene present in LIPI-3 under different conditions of acid stress. The primers used are listed in Table 2. The RT-qPCR reactions were performed in Rotor Gene Q Thermocycler (Qiagen, Hilden, Germany). The total volume of each reaction was 20 µL, consisting of 10 µL GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 0.4 µL of each primer (forward and reverse), 2 µL of cDNA and ultrapure free water (Promega).

The cycling parameters consisted of a 95 °C incubation for 2 min for enzyme activation and DNA denaturation, followed by 40 PCR amplification cycles consisting of 95 °C for 15s and 60 °C for 60 s, with fluorescent acquisition at the end of the annealing stage of each cycle. A no template negative control was included in each run and the thermocycling program was followed by a melting curve to confirm the amplification of the primer. Also, the DNA of *L. monocytogenes* Scott A (ATCC 49594) was utilized to verify the primer specificity and the no amplification of the *llsX* primer as this strain does not possess the LIPI-3 island (CLAYTON et al., 2011). The primer *rplD* was employed as reference gene for *L. monocytogenes* to normalize data and standardize measurements in RT-qPCR (Table 2).

Table 2. Primers used for the genomic expression analysis of LIPI-3 (RT-qPCR).

GENE	SEQUENCE	REFERENCE
<i>llsX</i>	F: TTATTGCATCAATTGTTCTAGGG R: CCCCTATAAACATCATGCTAGTG	CLAYTON et al., 2011
<i>rplD</i>	F: GTCCTTGACGTAGGGATGC R: GGAACAAACGCTGGCGAAAT	MIRANDA et al., 2018

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Comparative genomic analysis

L. monocytogenes is heterogeneous in virulence and LIPI-3 can present variability between strains, indicating that the island was acquired during lineages evolutions in *Listeria* (COTTER et al., 2008). Also is known that serovar 4b strains are more often isolated from severe invasive human cases and are the best representatives of epidemic *L. monocytogenes* strains (DOUMITH et al., 2004). Homologs of the 8 genes of LIPI-3 (*llsAGHXBYDP*) were located in 15 of the 35 isolates screened (43%), and all positive isolates belongs to lineage I (1/2b and 4b), what represents 68% of Lineage I isolates. Based on core genome sequence typing (cgMLST), LIPI-3 positive isolates were classified in only 4 of the 10 different SLs (SL1, SL3, SL218 and SL288). The distribution of LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) of the 4 different STs are described in figure 2.

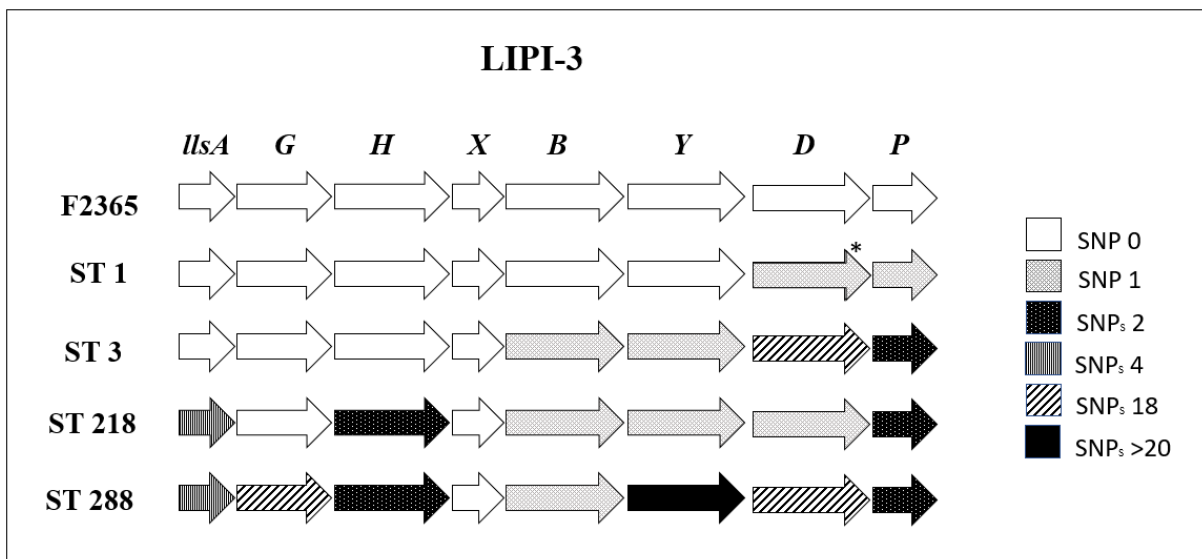


Figure 2. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis comparison of the 8 LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) of the 4 different STs compared to reference strain F2365. ST1 isolates: CLIST1011, CLIST1015, CLIST3735; ST3 isolates: CLIST2083, CLIST2138, 7, CLIST441, CLIST3865, CLIST3869; ST218 isolates: 74, 1282 and ST 288 isolate: CLIST3870. (*) SNP difference between isolates of ST1 group.

The analysis of the distribution and variation of the LIPI-3 genes among the isolates studied, revealed high similarity profile that presented low SNPs for the LIPI-3 genes in strains from clinical cases ST1 (4b). The similarity profile of the LIPI-3 genes (*llsAGHXBYDP*) with the reference strain F2365 was higher when compared to CC/ST1 (4b) isolates, followed by ST3 (1/2b), ST218 (4b) and ST288 (1/2b).

The three ST1 strains (CLIST 1011, CLIST 1015 and CLIST 3735) shared similar results and were isolated in São Paulo State in the year of 1985 from clinical cases. The strains CLIST 1011 and CLIST 3735 presented identical point mutations in LIPI-3, that consisted of single nucleotide polymorphisms (SNPs), occurring in the last two genes of the island (*llsD* and *llsP*). The isolate CLIST 1015 also presented the SNP, but only in *llsP* gene, being the most conserved LIPI-3 positive strain of this study. Quereda et al, (2016) demonstrated in his study that changes in LIPI-3 that resulted in mutations or deletions of *llsP* gene did not altered the LLS production or function *in vivo*.

ST 288 was the only ST that did not have clinical isolates linked to it, and it presented more divergences in the genes of the island compared to the reference strain (Figure 2), which suggests loss of virulence factors. These findings may be correlated to the adaptation of these *L. monocytogenes* isolates to the microbiological environment in which they were found, what may justify the need for functional or nonfunctional virulence factors.

A recent study showed that the heterogenicity in virulence presented by *L. monocytogenes* can be associated with the CC by MLST (MAURY et al., 2016). The Single nucleotide polymorphism analysis in the 8 genes of LIPI-3 from the isolates of this study revealed a highly compatible profile with the MLST classification. Although the MLST scheme is based on core genome genes to classify the isolates, and mutations are less likely to emerge in this specific gene population, therefore this technique may not provide the same

resolution as WGS, what may lead to differences in the characterization (KWONG et al., 2016).

It is worth noting, that several studies revealed the differences between WGS and other typing techniques, such as MLST and PFGE, for the molecular typing of *L. monocytogenes* (SCHMID et al., 2014; SALIPANTE et al., 2015; KWONG et al., 2016). Point mutations like single nucleotide polymorphism, that are detectable by WGS, are known to be acquired at a predictable rate, depending on the organism (BARRICK et al., 2009). Only WGS could potentially identify the novel DNA elements that accumulate among strains during the evolutionary time (KUMAR, 2005; SCHMID et al., 2014). Based on that, the study of comparison of strain relatedness can provide insights into a better and accurate separation of *L. monocytogenes* clonal groups and relate the virulence genes divergencies to medically relevant factors, potentially improving strain relationship epidemiologically.

The mechanisms that leads *L. monocytogenes* to attenuated virulence it is not completely understood, however a large proportion of isolates related to food sources have mutations in virulence genes. Its known that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* explains why these strains are less frequently associated with clinical cases or attenuated mammalian virulence (VAN STELTEN et al., 2010). Many studies consider the *lIsX* gene identification to predict the LIPI-3 presence or absence in *L. monocytogenes* strains, associating its presence to a high virulence potential (CHEN et al., 2019; VILCHIS-RANGEL et al., 2019; WANG et al., 2018).

lIsX is highly conserved in all different *L. monocytogenes* strains from this study, and it was only identified in LIPI-3 positive strains. Although a deeper comparison of the island revealed modifications of the reminiscent genes (*lIsB*, *lIsY* and *lIsD*) that can affect the functioning of the virulence factors, since they are predicted to form a synthetase complex

indispensable for the maturation of the LLS (Cotter et al., 2008). The *llsB* gene encodes for an protein, LlsB, necessary to perform posttranslational modification in LLS, and the deletion of *llsB* gene in mutant strains completely inactivated LLS in a blood agar test (QUEREDA et al., 2016).

LLS-containing *L. monocytogenes* strains are those associated with the majority of epidemic outbreaks of listeriosis (QUEREDA et al., 2016). However, the presence of LLS bacteriocin related genes, such as *llsX*, does not necessarily indicate the expression of the peptide produced by LIPI-3. Thus, the identification of *llsX* can be used to predict LIPI-3, but cannot be associated with the LLS production and should not implicate in higher virulence in strains that possess these gene.

LIPI-3 lineage I negative strains can possess homologs of the flanking rho-independent terminators genes (Imof2365_1111 and Imof2365_1120) that marks the outer limits of the island (COTTER et al., 2008). Although, the 5 negative LIPI-3 isolates from lineage I (4b), did not possess any of both genes. LIPI-3 genes were absent in all lineage II strains of this study, although the screening of the genes that flanks the island (Imof2365_1111 and Imof2365_1120) revealed the presence of its homologs in all 1/2c strains and in half of the 1/2a isolates.

Clayton *et al* (2011) revealed the presence of LIPI-3 clusters at various stages of reductive evolution in *L. innocua* isolates, and could not define if the LIPI-3 had gone under gradual loss in those strains as a result of a process of loss, or if it is happening as in a process of acquisition of new virulence factors.

3.2. SNP analysis of LIPI-3

LLS is a hemolytic and cytotoxic factor, encoded by the *llsa* gene *in vivo*, and it is known to contribute with virulence and survival of *L. monocytogenes* during infection (COTTER et al., 2008; QUEREDA et al., 2016). This peptide consists of a N- terminal leader

region as well as a C-terminal core region, with predominance of cysteine, serine and threonine residues, which allows post-translationally modifications resulting in the formation of a distinctive heterocyclic compound (MOLLOY et al., 2011). Mutant strains, with *llsA* deletion presented lower virulence levels *in vivo* murine models when compared to *llsA* conserved isolates (QUEREDA et al., 2016).

The results of the comparison between the isolates and the reference strain F2365 for the *llsA* gene showed that ST1 (4b) and ST3 (1/2b) shared 100% homology, while ST218 and ST288 presented SNPs in different regions of the gene that resulted in a lower similarity profile of 98% homology (Figure 3).

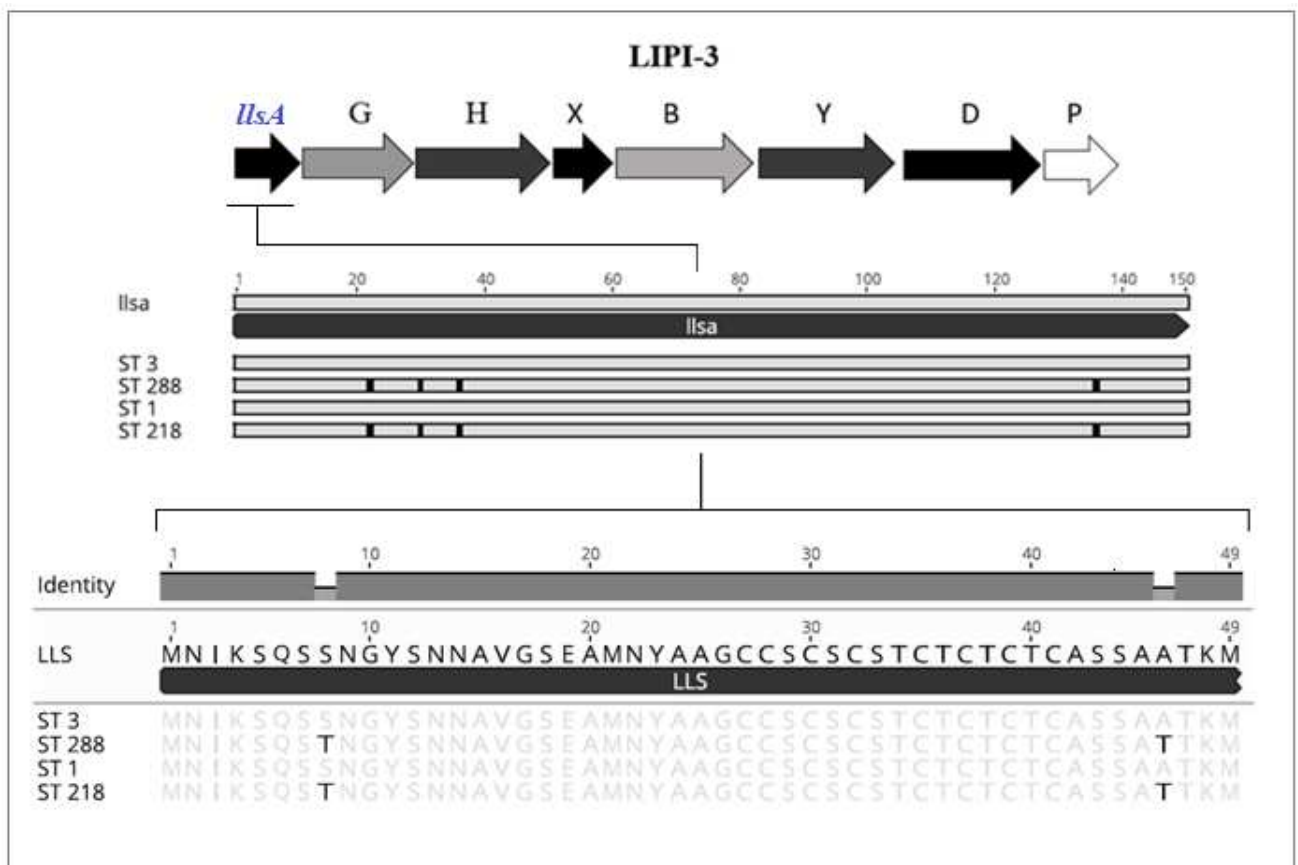
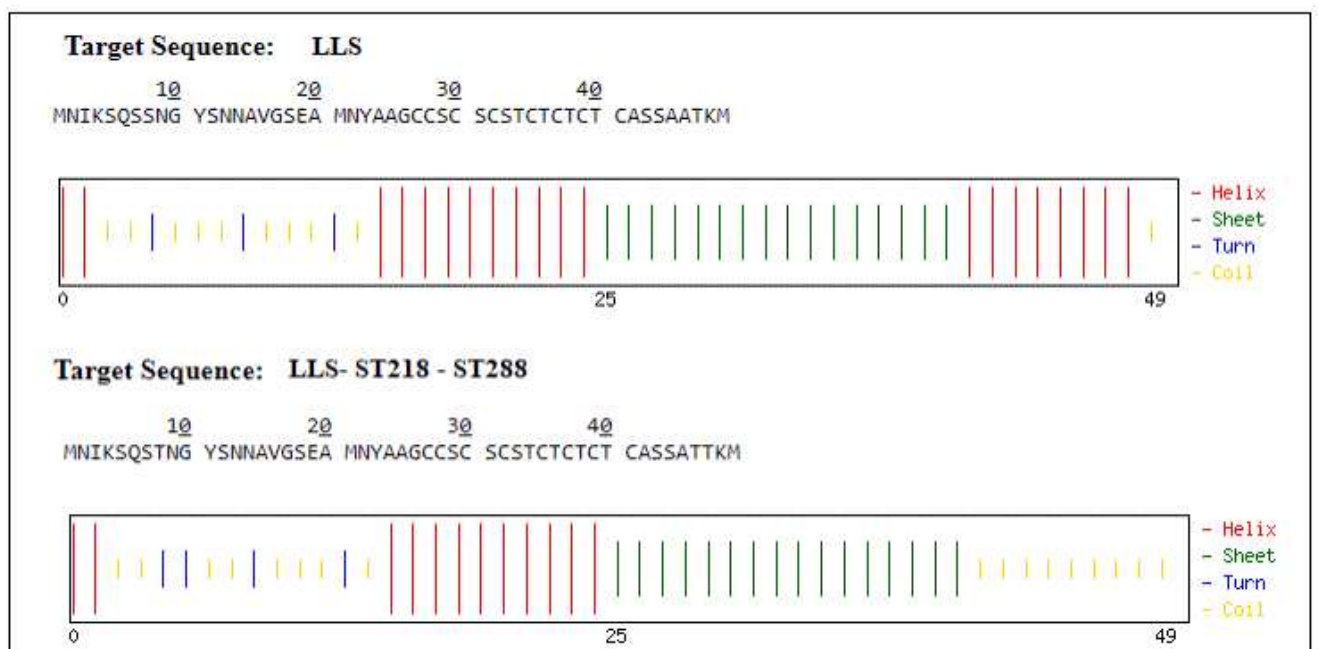


Figure 3. Representation of LIPI-3 island (*llsAGHXBYDP*). Alignment of the *llsA* gene of the four STs (3, 288, 1 and 218) compared to *llsA* gene of reference strain (F2365). Translation of *llsA* gene and LLS protein alignment of the four STs.

LLS plays a critical role in *L. monocytogenes* survival within the gastrointestinal tract, altering the host microbiota and favoring organ colonization (QUEREDA et al., 2016). LLS expression depends upon the integrity of LIPI-3 genes, a deeper assessment of *llsa* gene in *L. monocytogenes* that presented SNPs in different parts of the gene evaluated, showed that these point mutations when the *llsa* gene was translated, caused alterations of specific cleavage points in the structural protein formed (Figure 4). The predicted structure of the final peptide (LLS), was generated using Chou & Fasman Secondary Structure Prediction Server (CFSSP). Altogether, these results suggest that the final function of the LLS peptide may be also altered in these strains, since the post-translational peptide will not be correctly modified, what may result in a lower virulence potential of ST 218 and ST288 isolates.

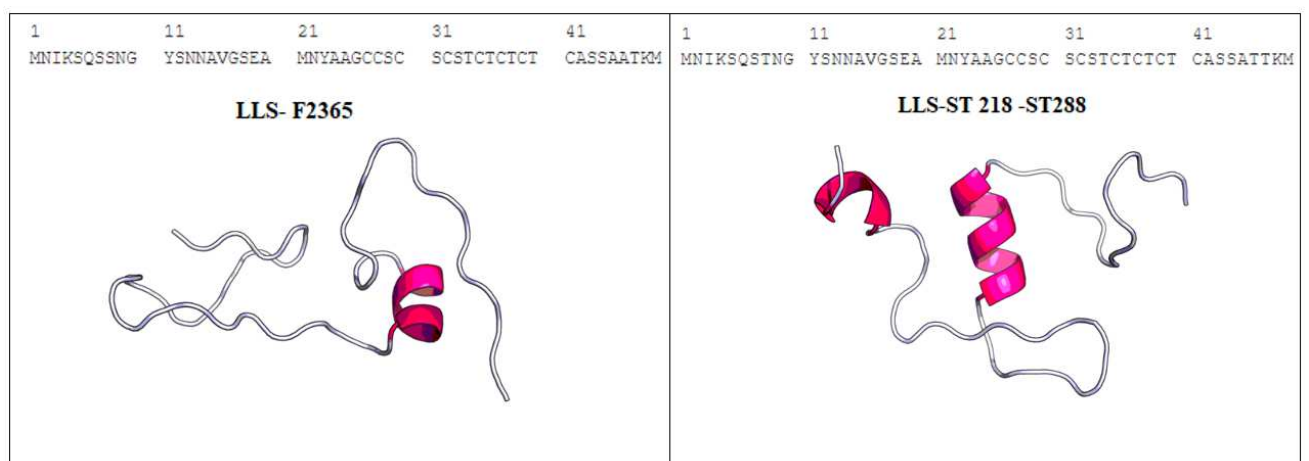
Figure 4. LLS sequence of the reference strain F2365 and LLS predicted sequence of strains harboring point mutations in the *llsa* gene (ST 218 and ST 288), designed by software CFSSP (<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman>).



Previous studies have already identified mutations in virulence genes of *L. monocytogenes* that led to an attenuation in the virulence profile of the strains (ROCHE et al., 2012). Point mutations in the genome of *Listeria* strains can result in a truncated and nonfunctional virulence factor, such as the loss of the *InlA* gene in some evolutionary strains (NIGHTINGALE et al., 2005; NIGHTINGALE et al., 2008).

Although LIPI-3 positive isolates have been associated with enhanced virulence potential of lineage I strains since it was discovered, the analysis of each individual gene of the island is important to understand the functionality of the encoded LLS, since structural alterations in LIPI-3 genes can lead to the production of an altered peptide with no function. The peptide sequences of F2365 (reference strain), ST218 and ST288, that showed divergent results, were subjected to a further analysis to predict their third structure (Figure 5), using software RaptorX (KÄLLBERG et al., 2012).

Figure 5. Predicted structure of the translated *llsA* gene sequence for the reference strain F265 and for the ST 218 and ST 288 isolates. The sequences were predicted using RaptorX (<http://raptorx.uchicago.edu/StructPredV2/predict/>).



Mutations in *inlB* gene , that plays a critical role during infection, of a lineage I strain (F2365) resulted in a reduced virulence potential of the strain, revealing that a spontaneous mutation in such specific virulence associated gene could have prevented severe human morbidity and mortality during an outbreak (QUEREDA et al., 2019). The natural habitat in which these strains were found justifies the expression of such virulence factors and can be responsible to determine if these factors represent an advantage or disadvantage for particular environments (RAGON et al., 2008). The results highlight WGS as a tool to explore differences in LIPI-3 and to establish the functionality of crucial virulence traits in *L. monocytogenes* isolates.

3.3. Genomic expression analysis of LIPI-3 (RT-qPCR)

Considering the genomic diversity evaluated by WGS of LIPI-3 positive isolates, three isolates were selected for the genomic expression of LIPI-3, *L. monocytogenes* strain F2365 was chosen as a representative of 4b strains and as reference strain for LIPI-3 expression. The complete genome sequence for this strain is available online (NC_002973), moreover, F2365 is an intensively studied strain in numerous laboratories (LEE et al., 2008; COTTER et al., 2008; CLAYTON., 2014). The isolate CLIST 441 was chosen as a representative of 1/2b (ST3) isolates that presented high homology with LIPI-3 genes of the island. The isolate CLIST 3870 ,1/2b (ST288), was selected because presented the least similar profile in all genes studied in LIPI-3, during genomic comparison, with a mutation on the *llyY* gene, that could affect the LIPI-3 expression.

The acid treatments for the genomic expression analysis chosen were the lower pHs (pH 3.5 and pH 4.5) to mimic gastric conditions, HCl 1M was added to the BHI culture as an inorganic acid, the BHI pH 7.5 was used as control medium to compare the results (Figure 6).

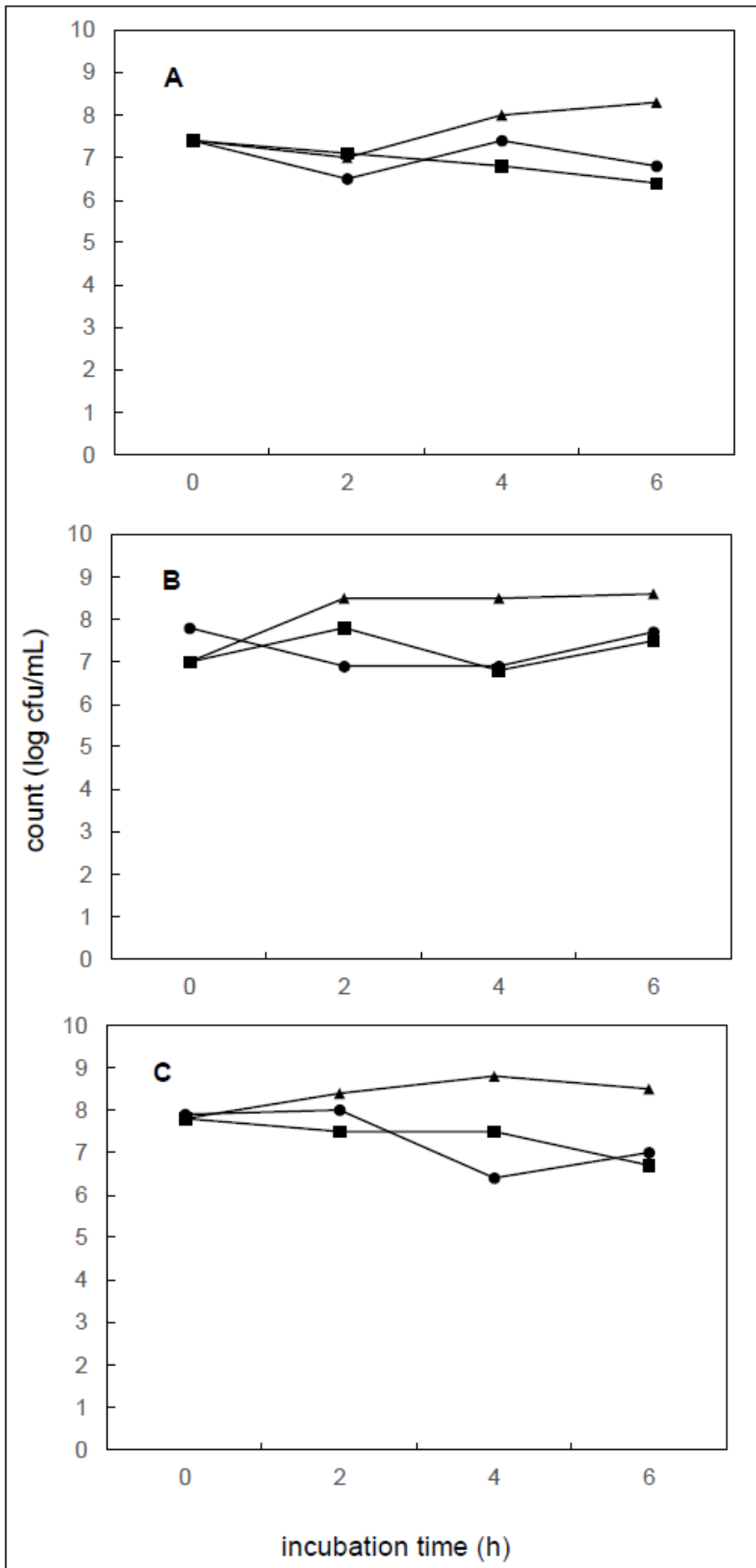


Figure 6. Results of growth in different acid stress conditions for the three *L. monocytogenes* isolates (A. F2365, B. CLIST441 and C. CLIST3870). Results are expressed in Log CFU/mL at different acid treatments during the incubation period (0, 2, 4, 6 h). The pH 7.5 (control treatment) is represented by triangles, the pH 3.5 by squares and pH 4.5 by circles.

Acid stress tolerance is an interesting feature of *L. monocytogenes*, since the pathogen is exposed to acid environments during the early phases of infection, such as stomach and phagosome environment (COTTER & HILL, 2003). During the evaluation of growth in different stress conditions, the three isolates presented similar results for the growth in control treatment (BHI pH 7.5), reaching maximum count value of 8 CFU/mL. Although, during the last hours of incubation (4 and 6 h) the growth curves of isolates 1/2b (CLIST 441 and CLIST 3870) showed relatively higher acid tolerance to the lower pHs (3.5 and 4.5), when compared to isolate 4b (F2365), (Figure 6).

The *llsX* gene was chosen to evaluate the expression of LIPI-3 island *in vitro*. While a number of genes were established to be essential for LLS production, *llsX* gene it is strain-specific marker for LIPI-3 expression, since no gene equivalent exists among other sag-like gene clusters (Clayton et al., 20014) and indeed it is the most conserved gene presented in the island, considering that any of the 15 isolates presented any dissimilarities in this gene, thus we investigated whether *llsX* is expressed under our study conditions (Table 3).

Table 3. Results of *llsX* gene expression in RT-qPCR for the three isolates (F2365, CLIST441 and CLIST3870) in response to the different acid stress conditions and incubation times (0, 2, 4 and 6 h).

ISOLATES	pH	0h	2h	4h	6h
F2365	3.5	+	+	+	+
	4.5	+	+	+	+
	7.5	+	+	+	+
CLIST441	3.5	+	+	+	-
	4.5	+	+	+	-
	7.5	+	+	+	-
CLIST3870	3.5	+	+	-	-
	4.5	+	+	-	-
	7.5	+	+	+	+

The three different isolates (F2365, CLIST 441 and CLIST 3870) presented expression of *llsX* gene in at least one of the conditions (pH 3.5, pH 4.5, pH 7.5) for each time of the study (0, 2, 4 and 6 h). The positive RT-qPCR results were tested to confirm a 200-bp amplification of the *llsX* gene by agarose gel electrophoresis.

F2365 (4b) presented the higher expression response when compared to CLIST 441 (1/2b) and CLIST3870 (1/2b), being capable to express *llsX* at all different treatments (pH 3.5 and pH 4.5) and also at control treatment (BHI), for all time intervals evaluated (0, 2, 4 and 6 h) in at least two of the repetitions. The expression profile was lower for the last hours of incubation for both 1/2b serotypes (CLIST 441 and CLIST3870). CLIST 441 did not express *llsX* after 6h incubation period in any of the stress treatments (pH 3.5 and pH 4.5) and also did not show expression in the control treatment (BHI). CLIST 3870 did not express *llsX* under stress conditions after 4 h and 6 h incubation period, but showed expression in the control treatment for those times. The absence of *llsY* functionality in CLIST 3870 due to a mutation in this gene, didn't interfered with the ability to express *llsX*, for at least the first four hours incubation in all tested treatment conditions of this study.

Its known that some virulence factors are activated during host entry and that acid stress acts as signal to prepare bacteria for infection (GAHAN & HILL, 2005). The role of *llsX* gene expression under acid stress conditions is unknown, although based on the results it could be inferred that may occur in response to the initial challenge in the first hours of acid stress treatment, and the lack of its expression during the last final hours may indicate the lack of response of the island itself. The LIPI-3 functionality is an important feature in the pathogenesis, and the function of the genes during the first hours of infection (6 h) may explain the virulence potential of different serotypes.

Some studies have linked the efficient stress response of *L. monocytogenes* 4b isolates to its higher virulence (NEUHAUS et al., 2013; WA-ECKA-ZACHARSKA et al., 2013). The

inability to express the virulence factor of the isolates CLIST 441 and CLIST3870 (1/2b) in such stress conditions after 6 h may infer in their pathogenic traits, highlighting that the only serotype to express *llsX* during the last hour of stress treatment (6 h) for both pHs, was the strain F2365 (4b). Several findings suggest that the ability to express virulence factors under different stress conditions is an important feature for higher pathogenesis in *L. monocytogenes* (MEKALANOS, 1992; COTTER et al., 1999; COTTER & HILL, 2003; RAENGPRADUB et al., 2008). Notwithstanding further evaluations must be placed to establish the role of *llsX* expression under stress and no stress conditions to understand adequately its role as a virulence factor in *L. monocytogenes* and to confirm if the LIPI-3 genes are also activated during acid stress responses.

4. CONCLUSION

The results provide insights into the distribution of LIPI-3 among *L. monocytogenes* isolates, the variation of mutations profiles among different STs may explain the virulence difference between *Listeria* isolates of the same serotype. Furthermore, data available on WGS will lead to a revision of current development of future risk assessments. The expression of *lIsX* under acid stress conditions after 6 h incubation was only observed in one of the three strains of the study: F2365 (4b), the effective expression of virulence genes in this serotype during acid stress conditions, may contribute to its higher infection potential.

5. REFERENCES

BARRICK, J. E. et al. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1243–1247, 2009.

CAMARGO, A.C., CASTILHO, N.P.A., SILVA, D.A.L., VALLIM, D.C., HOFER, E., NERO, L.A. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, p. 458-462, 2015.

CAMARGO, A.C., VALLIM, D.C., HOFER, E., NERO, L.A. Molecular serogrouping 294 of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. **Journal of Food Protection**, v.79, p.144-147, 2016.

CAMARGO, A. C., MOURA, A., AVILLAN, J., HERMAN, N., MCFARLAND, A. P., SREEVATSAN, S., CALL, D. R., WOODWARD, J. J., LECUIT, M., NERO, L. A., Whole-genome sequencing reveals *Listeria monocytogenes* diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil. **Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports**. In press.

CDC. The *Listeria* initiative. Centers for Disease Control and Prevention. Department of Health and Human Services. Disponível em <<https://www.cdc.gov/listeria/surveillance.html>> acesso em: 20 de Maio 2019.

CHEN, M. et al. Isolation, potential virulence, and population diversity of *Listeria monocytogenes* from meat and meat products in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 946, 2019.

CLAYTON, E. M. et al. Real-time PCR assay to differentiate listeriolysin S-positive and negative strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 163–171, 2011.

COTTER, P. D. et al. Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 21, p. 6840–6843, 1999.

COTTER, P. D. & HILL, C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 3, p. 429–453, table of contents, 2003.

COTTER, P. D. et al. Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000144, 2008.

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

GAHAN, C. G. M. & HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1345–1353, 2005.

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

KUMAR, S. Molecular clocks: four decades of evolution. **Nature Reviews Genetics**, v. 6, n. 8, p. 654–662, 2005.

KWONG, J. C. et al. Prospective Whole-Genome sequencing enhances national surveillance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 333–342, 2016.

LEE, S. W. et al. Discovery of a widely distributed toxin biosynthetic gene cluster. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 15, p. 5879–5884, 2008.

LIU, D. **Handbook of *Listeria monocytogenes***. [s.l.] Taylor & Francis, 2008.

MAURY, M. M. et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 308–313, 2016.

MIRANDA, R. O., CAMPOS-GALVÃO, M. E. M., NERO, L. A. et al. Expression of genes associated with stress conditions by *Listeria monocytogenes* in interaction with nisin producer *Lactococcus lactis*. **Food Research International**, v. 105, p. 897–904, 2018.

MOLLOY, E. M. et al. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing *sagA*. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 9, p. 670–81, 2011.

KÄLLBERG, M. et al. Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nature Protocols* v.7, p.1511–1522, 2012.

NEUHAUS, K. et al. Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces *prfA*, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. **Biomedical Central Genomics**, v. 14, n. 1, 2013.

NIGHTINGALE, K. K. et al. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8764–8772, 2005.

NIGHTINGALE, K.K. et al. *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. **Applied and Environmental Microbiology**., v.74, p. 6570–6583. 2008.

NYARKO, E. B. & DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes* : Strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2868–2878, 2015.

ORSI, R.H., BAKKER, H.C.D., WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 301 p. 79-96. 2011.

QUEREDA, J. J. et al. Bacteriocin from epidemic *Listeria* strains alters the host intestinal microbiota to favor infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 20, p. 5706–5711, 2016.

QUEREDA, J. J. et al. Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. **Gut Microbes**, p. 1–8, 2017.

QUEREDA, J. J. et al. Reassessing the role of internalin B in *Listeria monocytogenes* virulence using the epidemic strain F2365. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 252.e1-252.e4, 2019.

RAENGPRADUB, S., WIEDMANN, M., BOOR, K. J., et al. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 158–171, 2008.

RAGON, M. et al. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000146, 2008.

ROCHE, S. M. et al. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. **Biomedical Central Microbiology**, v. 12, n. 1, p. e1000146, 2012.

SALIPANTE, S. J. et al. Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1072–1079, 2015.

SCHMID, D. et al. Whole genome sequencing as a tool to investigate a cluster of seven cases of listeriosis in Austria and Germany, 2011-2013. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 431–436, 2014.

SMITH, A. et al. Sources and survival of *Listeria monocytogenes* on fresh, leafy produce.

Journal of Applied Microbiology, v. 125, n. 4, p. 930–942, 2018.

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

VAN STELTEN, A. et al. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2783–2790, 2010.

VILCHIS-RANGEL, R. E. et al. Association of *Listeria monocytogenes* LIPI-1 and LIPI-3 marker *lIsX* with invasiveness. **Current Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 637–643, 2019.

WA-ECKA-ZACHARSKA, E. et al. Salt stress-induced invasiveness of major *Listeria monocytogenes* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 216–221, 2013.

WANG, H. et al. Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 104–112, 2018.

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