

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues

Luisa Zanolli Moreno

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde de Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública
Orientador: Profa Associada Dra Maria Helena Matté

São Paulo

2013

Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues

Luisa Zanolli Moreno

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde de Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Serviço de Saúde Pública

Orientador: Profa Associada Dra Maria Helena Matté

São Paulo

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação.

Agradecimentos

Aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio durante todos esses anos de estudo.

À minha irmã pela companhia, compreensão e muitas risadas.

Ao Roberto por todo amor, carinho, companheirismo e paciência nesta vida que escolhemos compartilhar.

À Profa. Dra. Maria Helena Matté pela orientação e dedicação nesses anos de trabalho.

À Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela orientação e companheirismo durante todos esses anos de trabalho. A senhora me deu todas as possibilidades, sem as quais eu não chegaria onde estou.

À Renata Paixão e ao Dr. Ernesto Hofer, que gentilmente cederam-nos as cepas que compõem este estudo.

Às colegas do Laboratório de Saúde Pública pela ajuda e paciência.

À Kel, Miriam, Mari, às Patrícias da minha vida (Patty e Paty), Rafa, Beth, Camila e Lícia pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos. Meninas, vocês complementam a minha vida... Muitas conversas e muitas risadas, momentos inesquecíveis...

À Dra Ana Maria que acompanhou todos os momentos desta fase da minha vida com muito carinho e atenção.

Agradecimentos especiais ao Dr. Didier Cabanes, do Instituto de Biologia Molecular e Celular/Universidade do Porto, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e grupo de pesquisa, e Filipe Carvalho, Teresa Almeida, Rita Pombinho e Sandra Reis que me acolheram e ensinaram muito em pouco tempo.

Ao Programa Santander de Bolsas de Mobilidade Internacional e à Pró Reitoria de Pós-Graduação da Universidade de São Paulo que possibilitaram o intercâmbio com a Universidade do Porto (Instituto de Biologia Molecular e Celular).

À FAPESP pelo auxílio financeiro nestes projetos de pesquisas.

Moreno LZ. Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Resumo

Introdução - A bactéria *Listeria monocytogenes* é um agente zoonótico transmitido, principalmente, por alimentos. Dentre as fontes de contaminação, destacam-se os produtos de origem láctea, carnes e embutidos, além dos ambientes da indústria de processamento alimentício. Na última década, foram detectadas cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, em ambiente de frigoríficos e alimento. Estas apresentavam variação na intensidade da virulência para células eucarióticas decorrente de mutações nos genes de virulência. Esta alteração em ambas as espécies, e o relato de um caso fatal de listeriose humana ocasionada por *L. innocua* atípica demandam atenção, pois apresentam maior risco à saúde da população exposta a estes ambientes e alimentos tornando-se, portanto, uma importante questão de saúde pública. **Objetivo** - Pesquisar genes de virulência em cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, isoladas em pontos da linha de abate suíno e do comércio de carne no Estado de São Paulo. **Material e Métodos** – Foram estudadas 40 cepas, dentre estas, isolados de *L. monocytogenes* e *L. innocua* com atividade hemolítica atípica. Foram realizados testes de atividade hemolítica e produção de fosfolipase A para caracterização dos isolados. A detecção dos genes de virulência foi realizada através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). Para confirmação das sequências amplificadas e a análise das mesmas, os fragmentos obtidos foram sequenciados. A identificação molecular das espécies foi realizada por análise filogenética dos genes *prs* e 16S rRNA. **Resultados** – Dos 40 isolados, cinco de *L. monocytogenes* e sete de *L. innocua* apresentaram atividade hemolítica atípica, sendo que nestes últimos também foi observado halo atípico no meio ALOA[®]. As cepas de *L.*

monocytogenes foram positivas para a detecção de todos os genes de virulência estudados. Dois dos isolados atípicos de *L. innocua* também foram positivos para todos os genes e os outros cinco foram positivos para *hly*, *plcA* e *inlC*. Foram detectadas mutações nas proteínas InlC, InlB, InlA, PI-PLC, PC-PLC e PrfA, nas cepas atípicas, que resultaram em alterações nas suas estruturas secundárias que podem explicar o fenótipo desses isolados. A confirmação de espécie apenas foi alcançada com a análise filogenética do 16S rRNA. **Conclusões** – A partir desses resultados, foi proposta a utilização dos genes *prfA*, *plcB* e *inlB*, como forma de triagem, para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, de modo a complementar os testes fenotípicos.

Descritores: *L. monocytogenes*; *L. innocua*; Genes de virulência; Carne suína

Moreno LZ. Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues. / Research of virulence genes in strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* originated from pork and slaughterhouse and meat market environment [dissertation]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2013.

Abstract

Introduction - The bacterium *Listeria monocytogenes* is a zoonotic agent transmitted, mainly, by food. Among the sources of contamination, stands out dairy products, meat and the environments of food processing industry. In the last decade, strains of *L. monocytogenes* and *L. innocua* have been detected in food and slaughterhouses environment. These presented variation in the intensity of virulence to eukaryotic cells due to mutations in the virulence genes. These changes in both species, and the report of a fatal case of human listeriosis caused by atypical *L. innocua* demand attention, because they present greater risk to the health of the population exposed to these environments and food and, therefore, it is an important public health issue. **Objective** - To search for the virulence genes in strains of *L. monocytogenes* and *L. innocua* isolated in points of swine slaughter line and meat trade in Sao Paulo State. **Material and Methods** – 40 strains were studied, among these, isolates of *L. monocytogenes* and *L. innocua* with atypical hemolytic activity. Tests of hemolytic activity and production of phospholipase A were performed for isolates characterization. The detection of virulence genes was performed through polymerase chain reaction (PCR). For confirmation of the amplified sequences and analysis of the same, the obtained fragments were sequenced. The molecular identification of species was performed by phylogenetic analysis of 16S rRNA and *prs* genes. **Results** - Of the 40 isolates, five *L. monocytogenes* and seven *L. innocua* showed atypical hemolytic activity, and in these last ones an atypical halo was also

observed in ALOA[®] medium. The *L. monocytogenes* strains were positive for detection of all virulence genes studied. Two atypical *L. innocua* isolates were also positive for all genes and the other five were positive for *hly*, *plcA* and *inlC*. Mutations in InlC, InlB, InlA, PI-PLC, PC-PLC and PrfA proteins were detected, in the atypical strains, which resulted in changes in their secondary structures that may explain the isolates phenotype. Species confirmation was achieved only with phylogenetic analysis of 16S rRNA. **Conclusions** - From these results, it was proposed the use of *prfA*, *plcB* and *inlB* genes as a way of screening, to differentiate the species *L. monocytogenes* and *L. innocua*, in order to complement the phenotypic tests.

Descriptors: *L. monocytogenes*; *L. innocua*; Virulence genes; Pork

Índice

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	20
1.2 <i>Listeria innocua</i>	25
1.3 LISTERIOSE HUMANA	26
1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>Listeria</i>	29
1.5 FISIOPATOLOGIA	33
1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA	36
1.6.1 Hemolisina	36
1.6.2 Fosfolipases	38
1.6.3 Internalinas	39
1.7 ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E O FATOR REGULADOR POSITIVO	42
1.8 DIVERSIDADE NA VIRULÊNCIA	45
1.9 HISTÓRIA DAS CEPAS DO PRESENTE ESTUDO	48
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1 CEPAS BACTERIANAS	52

4.2 REISOLAMENTO	53
4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA FOSFOLIPASE A (PI-PLC)	54
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA	54
4.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO	54
4.6 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA	54
4.7 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rRNA E <i>prs</i>	55
4.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	57
4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR	57
4.10 SEQUENCIAMENTO	57
4.11 MAPEAMENTO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E ANÁLISE DOS RESULTADOS	58
4.12 IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS PROTEICOS	59
4.13 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS	59
4.14 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES 16S rRNA E <i>prs</i>	59
5. RESULTADOS	61
5.1 CEPAS BACTERIANAS	61
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E DA PRODUÇÃO DA FOSFOLIPASE A (PI-PLC)	62
5.3 PESQUISA E MAPEAMENTO DOS GENES DE VIRULÊNCIA	64
5.3.1 Detecção e amplificação completa dos genes de virulência	64
5.3.2 Pesquisa de mutações nos genes de virulência	70
5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS PROTEICOS	71

5.5 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS	75
5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE <i>Listeria</i> sp.	76
6. DISCUSSÃO	80
7. CONCLUSÕES	88
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
9. ANEXOS	100
Anexo 1	100
Anexo 2	103
Anexo 3	105
Anexo 4	107
CURRÍCULO LATTES	

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Distribuição das cepas de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> segundo origem e sorotipo – N (%).	61
Tabela 2 -	Descrição das cepas estudadas e resultados dos testes de hemólise e produção da Fosfolipase A em meio ALOA [®] .	63
Tabela 3 -	Distribuição da detecção inicial dos genes <i>prfA</i> , <i>inlC</i> , <i>inlJ</i> e <i>inlAB</i> em cepas de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> .	65
Tabela 4 -	Distribuição dos resultados para cada par de iniciadores segundo espécie.	69

Lista de Figuras

- Figura 1 - Representação esquemática da fisiopatologia da infecção por *L. monocytogenes*. 34
- Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes*. 35
- Figura 3 - Cultura de *L. monocytogenes* em ágar sangue de carneiro evidenciando os halos de β -hemólise ao redor e embaixo das colônias. 37
- Figura 4 - Representação esquemática da LIPI-1 e operon *inlAB*. 44
- Figura 5 - Resultados das provas fenotípicas. 62
- Figura 6 - Substituições nucleotídicas observadas nos genes *inlC*, *plcA*, *plcB* e *inlB*. 72
- Figura 7 - Substituições de aminoácidos nas proteínas InlC, PI-PLC, PC-PLC, InlB e PrfA. 73
- Figura 8 - Substituições nucleotídicas observadas nos genes *inlA* e *hly* (A) e mutações detectadas nas proteínas InlA e Hly (B). 74
- Figura 9 - Dendrograma demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *Listeria* com base nas sequências nucleotídicas do gene *prs*. 77
- Figura 10 - Dendrograma demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *Listeria* com base nas sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA. 79

Lista de Quadros

Quadro 1 -	Lista de iniciadores empregados para a pesquisa dos genes de virulência.	56
Quadro 2 -	Iniciadores desenhados para a pesquisa dos genes de virulência estudados.	67
Quadro 3 -	Iniciadores desenhados para a pesquisa do gene de virulência <i>inlJ</i> .	68

Lista de Anexos

Anexo 1 -	Lista de iniciadores desenvolvidos neste estudo para pesquisa de genes de virulência <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>hly</i> , <i>plcA</i> , <i>plcB</i> , <i>prfA</i> , <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> ..	100
Anexo 2 -	Resultados encontrados para os iniciadores propostos para a amplificação dos genes de virulência nas cepas estudadas.	103
Anexo 3 -	Informações das sequências retiradas do GenBank e utilizadas nas análises comparativas dos genes de virulência e de identificação de espécie.	105
Anexo 4 -	Resultados encontrados para a predição das estruturas secundárias das proteínas estudadas.	107

Lista de Abreviaturas

<i>actA</i> -	Gene da Proteína indutora de montagem da Actina
ActA -	Proteína indutora de montagem da Actina
AFLP -	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados
Ala -	Alanina
ALOA -	Ágar <i>Listeria</i> acc. Ottaviani & Agosti
ATCC -	American Type Culture Collection
BAM -	Bacteriological Analytical Manual
C1qR -	Receptor do componente C1q
CAMP -	Fator de Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC -	Center of Disease Control
CDTX -	Toxinas formadoras de poros colesterol dependentes
CLIP	<i>Listeria</i> Collection of Insitut Pasteur
cm -	Centímetro
CTAB -	Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio
DIM -	Differentiation /Innocua /Monocytogenes
DL50 -	Dose letal mediana
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs -	Desoxirribonucleotídeo tri-fosfatado
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERIC-PCR -	Análise de Sequências Repetitivas de Consenso Intergênico em Enterobactérias
EUA	Estados Unidos da América
FDA -	Food and Drug Administration
FMVZ -	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Fw -	Forward
His -	Histidina
HIV -	Vírus da imunodeficiência humana
Hly -	Listeriolisina O
<i>hly</i> -	Gene da Listeriolisina O

Ile -	Isoleucina
InlA -	Internalina A
<i>inlA</i> -	Gene da Internalina A
InlB -	Internalina B
<i>inlB</i> -	Gene da Internalina B
InlC -	Internalina C
<i>inlC</i> -	Gene da Internalina C
InlJ -	Internalina J
<i>inlJ</i> -	Gene da Internalina J
Kb -	Quilo bases
kDa -	Quilo Dalton
LEB -	Caldo de Enriquecimento de <i>Listeria</i>
Leu -	Leucina
LIPI 1 -	Ilha de Patogenicidade de <i>Listeria</i> 1
LLO -	Listeriolisina O
LRR -	Regiões ricas em leucina
Lys -	Lisina
Met -	Fator de crescimento de hepatócitos
Met -	Metionina
mL -	Mililitro
MLEE -	Eletroforese de enzima multiloco
mM -	Milimol
<i>mpl</i> -	Gene da Metaloprotease
Mpl -	Metaloprotease
pb -	Pares de bases
PC-PLC -	Fosfatidilcolina fosfolipase C
PCR -	Reação em cadeia pela polimerase
PFGE -	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
pH -	Potencial de Hidrogênio
Phe -	Fenilalanina
PI-PLC -	Fosfatidilinositol fosfolipase C

PlcA -	Fosfolipase A
<i>plcA</i> -	Gene da Fosfolipase A
<i>plcB</i> -	Gene da Fosfolipase B
PlcB -	Fosfolipase B
PrfA -	Fator Regulador Positivo
<i>prfA</i> -	Gene do Fator Regulador Positivo
<i>prs</i> -	Gene da fosforribosil pirofosfato sintetase
RAPD -	Amplificação randômica de DNA polimórfico
REA -	Análise com enzimas de restrição
RFLP -	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição
RNA -	Ácido ribonucleico
rRNA -	RNA ribossômico
Rv -	Reverse
Ser -	Serina
<i>sig^B</i> -	Gene da proteína sigmaB
TAE -	Tampão tris-acetato-EDTA
TSA -	Ágar soja triptona
Thr -	Treonina
Tyr -	Tirosina
U -	Unidade
USP -	Universidade de São Paulo
V -	Voltz
Val -	Valina
µg -	Micrograma
µL -	Microlitro
µM -	Micromol
σ^B -	Gene da proteína sigmaB
°C -	Graus Celsius
% -	Porcentagem

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* é composto por micro-organismos que têm característica cosmopolita e são classificados como coco-bacilos gram-positivos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos. Atualmente são descritas oito espécies pertencentes ao gênero: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* (LOW e DONACHIE, 1997; LECLERCQ et al., 2009; GRAVES et al., 2010). Apenas as espécies *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são consideradas patogênicas para os animais e para o homem, respectivamente (FABER e PETERKIN, 1991; ORSI et al., 2011).

Com exceção de *L. grayi*, todas as demais espécies de *Listeria* são consideradas contaminantes de alimentos. *L. monocytogenes* é a espécie mais estudada do gênero desde o seu reconhecimento como importante patógeno de origem alimentar na década de 1980, quando ocasionou surtos epidêmicos de listeriose humana em países da América do Norte e União Européia (FABER e PETERKIN, 1991; JACQUET et al., 1995; LUNDEN et al., 2000).

Os micro-organismos do gênero *Listeria* são considerados, na indústria alimentícia, bactérias de controle complexo pela sua capacidade de multiplicar em baixas temperaturas e aderir e formar biofilme em diversas superfícies de contato (LUNDEN et al., 2000). A presença de mais de uma espécie de *Listeria* no mesmo alimento ou ambiente é frequente (LACIAR et al., 2006), especialmente *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Dessa forma, é necessário diferenciar estes micro-organismos, principalmente, pela importância de *L. monocytogenes* para a saúde humana.

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular, descrito inicialmente por MURRAY et al. (1926) como *Bacterium monocytogenes*, capaz de ocasionar uma leucocitose mononuclear típica em coelhos. Posteriormente, o mesmo micro-organismo foi isolado em roedores e foi denominado de *Listerella hepatolytica* em homenagem ao cirurgião britânico Sir Joseph Lister e, apenas em 1940, foi definida a denominação de *Listeria monocytogenes* (BREED et al., 1948).

L. monocytogenes é um micro-organismo ubiqüitário, capaz de se multiplicar em temperaturas entre $-0,4^{\circ}\text{C}$ e 50°C , o que favorece a sua existência em qualquer ambiente. O micro-organismo possui flagelos peritríquios que lhe conferem mobilidade característica em temperaturas de incubação de 20 a 25°C . O agente apresenta atividade hemolítica sendo que sua β -hemolisina gera o efeito conhecido como fator CAMP, que corresponde à hemólise na presença de outros agentes no meio, descrito por Christie, Atkins e Munch-Petersen em 1944. No entanto, há controvérsia quanto à utilização da atividade hemolítica como método de distinção das espécies do gênero. A interpretação da hemólise de *L. monocytogenes* pode ser problemática pela variação em sua intensidade, de forma que algumas cepas com baixa atividade hemolítica podem ser erroneamente classificadas como não hemolíticas (KHAN et al., 1972; SKALKA et al., 1982; RODRIGUEZ et al., 1986).

Por se tratar de um micro-organismo ubiqüitário, *L. monocytogenes* pode ser isolada do solo, da vegetação, de matéria fecal, do esgoto e da água (ROCOURT e SEELIGER 1985; RYSER e MARTH, 1991). Também já foi detectada em distintas espécies animais como bovinos, ovinos, caprinos, aves, suínos e animais silvestres

(GRAY e KILLINGER, 1966; CHASSEIGNAUX et al., 2001). Dentre os alimentos associados aos surtos de listeriose destacam-se os vegetais e os produtos de origem animal, lácteos e cárneos (SCHLECH et al., 1983; FABER e PETERKIN, 1991; NASCIMENTO e CULLOR., 1994; SCHLECH, 2000).

Com base na presença dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), o agente pode ser tipificado em 13 sorotipos distintos (SEELIGER e HÖHNE, 1979; FABER e PETERKIN, 1991), sendo que os sorotipos 4b, 1/2b e 1/2a estão relacionados com a maioria dos casos de listeriose humana (FABER e PETERKIN, 1991; LIU, 2006; HONG et al., 2007). O sorotipo 4b está frequentemente associado a surtos epidêmicos, enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b são associados com infecções esporádicas (WIEDMANN, 2002). O sorotipo 1/2c é o mais encontrado no ambiente e em amostras de diversos alimentos, sendo considerado não-patogênico para o homem.

Como a sorotipificação não é atualmente utilizada como ferramenta epidemiológica para o estudo de *Listeria*, outros métodos foram desenvolvidos para a diferenciação do agente. Distintos métodos genotípicos têm sido aplicados para caracterização epidemiológica da bactéria, sendo os mais citados a amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD), a análise com enzimas de restrição (REA), análise de sequências repetitivas de consenso intergênico em enterobactérias (ERIC-PCR), polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), a eletroforese em campo pulsado (PFGE) (GIOVANNACCI et al., 1999; CHASSEIGNAUX, et al., 2001) e o polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) (GUERRA, et al., 2002; KETO-TIMONEN et al., 2003). Estas técnicas possibilitam a diferenciação de amostras de um mesmo sorogrupo e sorotipo

a partir do seu perfil genotípico, e também permitem a distinção da origem dos isolados, seja esta ambiental, alimentar, humana ou mesmo animal.

Neste contexto, a partir de métodos moleculares como a eletroforese de enzima multiloco (MLEE), a ribotipagem, a análise de perfis de restrição com endonucleases, a PFGE e o sequenciamento de DNA, os isolados de *L. monocytogenes* foram classificados em distintos grupos ou divisões filogenéticas denominadas linhagens. Inicialmente, foram determinadas duas linhagens, a linhagem I composta pelos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, e 4e, e a linhagem II que incluía os isolados dos sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a; posteriormente, foram identificados isolados dos sorotipos 4a e 4c caracterizados como uma terceira divisão (linhagem III) que também incluía cepas atípicas do sorotipo 4b e que poderia ainda ser dividida na linhagem IV (ORSI et al., 2011).

Os isolados da linhagem I, especificamente do sorotipo 4b, estão relacionados com a maioria dos surtos de listeriose humana no mundo (ORSI et al., 2011), embora as cepas de *L. monocytogenes* desta linhagem não sejam muito detectadas nos alimentos. Esta é a realidade americana, na qual há predominância da linhagem I nos casos de infecção alimentar (JEFFERS et al., 2001). Já no norte da Europa, predomina a linhagem II (sorotipo 1/2a) nos casos de listeriose (LUKINMAA et al., 2003; PARIHAR et al., 2008), sendo que esta linhagem também é frequentemente isolada de alimentos (GRAY et al., 2004; CHEN et al., 2009; LOMONACO et al., 2009) devido à sua maior capacidade de sobreviver e de persistir nos ambientes da indústria alimentícia e nos próprios alimentos (ORSI et al., 2011).

Apesar de ser um patógeno alimentar de importância mundial, poucas informações estão disponíveis sobre a epidemiologia de *L. monocytogenes* no Brasil.

Os casos de listeriose são considerados como subdiagnosticados e subnotificados e ainda não existe relato de listeriose de origem alimentar confirmado no país; no entanto, pesquisadores estudam a prevalência e as características de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de infecção humana e de distintas amostras ambientais e alimentares com o intuito de estabelecer a via de transmissão do agente (CRUZ et al., 2008a).

Dessa forma, já foram descritos, em diversos Estados no Brasil, casos de meningite, peritonite, aborto, infecção neonatal e diarreia ocasionados por *L. monocytogenes* (LEAL et al., 1983; HOFER et al., 1998; NORBERG et al., 2005; MARTINS et al., 2010). Os sorotipos detectados no país durante o período de 1969 a 2000 foram: 4b, 1/2b, 1/2a, 4a, 1/2c e 3a (HOFER et al., 2006). Mais recentemente, entre 2006 e 2007, foram descritos seis casos de listeriose em pacientes idosos de um hospital no Rio de Janeiro (MARTINS et al., 2010). Os pacientes encontravam-se imunossuprimidos e, segundo os pesquisadores, contraíram a infecção dentro do hospital, provavelmente, a partir da alimentação.

No Brasil, a bactéria já foi isolada de produtos lácteos (SILVA et al., 2001; SILVA et al., 2006; BRITO et al., 2008; NES et al., 2010), embutidos (DESTRO et al., 1991; BORGES et al., 1999; DUVAL et al., 2003; DEGENHARDT e SANT'ANNA, 2007; MIYASAKI et al., 2009; MARTINS e GERMANO, 2011), ambientes de abatedouros de frango (BARBALHO et al., 2005; CHIARINI et al., 2009), de suínos (FERRONATTO, 2010; PAIXÃO, 2010) e de camarão (DESTRO et al., 1996), além de carne de peixe (CRUZ et al., 2008b; SOUZA et al., 2008), bovina (BARROS et al., 2007; MANTILLA et al., 2007), suína (FERRONATTO, 2010; PAIXÃO, 2010) e equina (ASSIS et al., 2000).

Nas últimas duas décadas, o estudo da epidemiologia molecular do agente no país evoluiu muito, evidenciando possíveis rotas de contaminação ambiental e a alta similaridade genética existente entre os isolados de ambiente e alimento (DESTRO et al., 1996; BARROS et al., 2007; BRITO et al., 2008; CRUZ et al., 2008b) com os de origem humana (BARBALHO et al., 2005; BUENO et al., 2010; PAIXÃO, 2010).

Ocorreram, também, muitos avanços na pesquisa dos genes de virulência de *L. monocytogenes* a partir da utilização dos métodos moleculares. Neste contexto, foram identificados marcadores moleculares de patogenicidade para a análise de cepas de *L. monocytogenes* de origem humana e ambiental e, a partir destes, foi possível detectar e caracterizar isolados atípicos com baixa virulência (ROCHE et al., 2003; 2005; TEMOIN et al., 2008; ROCHE et al., 2009). Estas cepas, em sua maioria originárias de alimentos, possuem os genes de virulência de *L. monocytogenes* com determinadas mutações que impossibilitam ou interferem na expressão gênica. Dessa forma, os mecanismos de virulência dessas cepas atípicas são comprometidos em níveis distintos, originando efeitos variados nos ensaios de virulência *in vivo* e *in vitro* (ROCHE et al., 2003; 2005; TEMOIN et al., 2008; ROCHE et al., 2009).

1.2 *Listeria innocua*

L. innocua, assim como as outras espécies pertencentes ao gênero *Listeria*, é um micro-organismo ubiqüitário, capaz de se multiplicar em temperaturas entre $-0,4^{\circ}\text{C}$ e 50°C e que sobrevive em ambientes de extremo pH e alta concentração de sal (BUCHRIESER et al., 2003). Esta espécie é capaz de metabolizar o enxofre, metano e nitrogênio, entre muitos outros compostos orgânicos e inorgânicos. Trata-se de micro-organismos anaeróbios facultativos, de tal forma que, sob o metabolismo aeróbico *L. innocua* produz ácido láctico e ácido acético; já em condições de anaerobiose, o metabolismo da glicose produz apenas ácido láctico (BROOKS et al., 1989).

Como integrante do gênero *Listeria*, a espécie *L. innocua* é caracterizada com reações negativas para oxidase e indol, e positiva para catalase, embora existam relatos de isolados de *L. monocytogenes* negativos para prova da catalase (BUBERT et al., 1997). A espécie é fenotipicamente muito semelhante à *L. monocytogenes*, distinguindo-se apenas em relação à sua capacidade hemolítica (MURRAY et al., 1999). Bioquimicamente, apenas a ausência da enzima arilamidase (DIM teste) diferencia as duas espécies (BILLE et al., 1992).

L. innocua já foi isolada de várias fontes ambientais como água, solo, esgoto e vegetais, além dos alimentos e ambientes da indústria alimentícia (VOLOKHOV et al., 2007; MCLAUCHLIN e REES, 2009). Pelo fato de as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* serem frequentemente isoladas de amostras de alimento e ambiente, faz-se necessária a sua diferenciação pela importância da primeira para a saúde humana. Como a distinção fenotípica é controversa e a sorotipificação por

soroaglutinação também pode apresentar resultados dúbios, novos métodos foram propostos para a identificação destes micro-organismos.

1.3 LISTERIOSE HUMANA

A listeriose humana é ocasionada pela infecção por *L. monocytogenes*. Esta afeta, sobretudo, gestantes, neonatos, idosos e indivíduos com imunossupressão (GELLIN et al., 1991; GIOVANNACCI et al., 1999). Também acomete indivíduos com diabetes mellitus, alcoolismo e doenças cardiovasculares e renais (NIEMAN e LORBER, 1980). Os indivíduos saudáveis possuem anticorpos contra *L. monocytogenes* devido ao fato de o agente participar da flora normal do trato intestinal (GRAY e KILLINGER, 1966; FARBER e PETERKIN, 1991).

O quadro clínico da listeriose é distinto entre adultos imunocomprometidos, gestantes e neonatos. Em indivíduos imunossuprimidos a infecção acomete, principalmente, o sistema nervoso central e, a partir do episódio de bacteremia pode ocorrer endocardite, além de infecções focais acometendo articulações, pulmões e fígado. Nas gestantes, a infecção causa aborto no terço final da gestação. A mãe apresenta sintomatologia semelhante a um quadro gripal que pode ser acompanhado pela diminuição dos movimentos fetais, podendo ocorrer também parto prematuro. A infecção por *L. monocytogenes* ainda pode ocorrer na forma não invasiva, limitada ao intestino, caracterizada por um quadro clínico de gastroenterite febril (FARBER e PETERKIN, 1991).

O neonato pode apresentar duas formas clínicas de listeriose: a precoce e a tardia. Na primeira, a infecção ocorre já na vida intra-uterina e a sintomatologia clínica aparece com 36 horas após o parto, sendo denominada de granulomatose

infantisséptica. A forma tardia ocorre 14 dias após o parto, sendo a meningite a principal manifestação. A fonte de infecção não é totalmente conhecida nesses casos; no entanto, há indícios de que o neonato se contamine a partir do canal cervical durante o parto (MCLAUHLIN, 1990).

Apesar de baixa incidência, a listeriose apresenta um grande risco à saúde pública pela severidade de suas sequelas e pelo elevado índice de mortalidade (20% a 30%) nas populações de risco (FARBER e PETERKIN, 1991; MEAD et al., 1999). No entanto, na última década, houve aumento na incidência de listeriose no cenário europeu (ALLERBERGER e WAGNER, 2010). De 2008 a 2009, houve aumento de 19% na incidência de listeriose na União Européia com taxa de fatalidade de 17% (EFSA, 2011). No mesmo período, nos Estados Unidos da América (EUA), foram registrados quatro surtos alimentares da doença e incidência de 0,29 casos para cada 100.000 habitantes (ANGULO, 2009). Foi constatada redução da incidência da listeriose de 1996-1998 a 2010 (CDC, 2012a). No entanto, no segundo semestre de 2011, ocorreu um dos maiores surtos de listeriose nos EUA, ocasionando mais de 30 mortes, e em 2012 foi relatado um surto que acometeu 22 indivíduos e resultou em quatro mortes (CDC, 2011a; 2012b).

De 1996-1998 a 2010, a listeriose acometeu, principalmente, os idosos (CDC, 2012a). Destaca-se, também, o crescente grupo de risco de pacientes com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e câncer (JURADO et al., 1993; RIVERO et al., 2003; SAFDAR e ARMSTRONG, 2003; GOULET et al., 2011). Dentre os pacientes mais afetados pela doença encontram-se os indivíduos submetidos à quimioterapia, terapia com glicocorticóides e hemodiálise (RIVERO et al., 2003; SAFDAR e ARMSTRONG, 2003). Apesar de existirem muitos relatos de listeriose nestes grupos

de risco, ainda há uma teoria de que a utilização de antibióticoterapia profilática nestes pacientes poderia reduzir a incidência da doença (SAFDAR e ARMSTRONG, 2003; MOOK et al., 2011).

No Brasil, há relatos de listeriose em diversos Estados incluindo São Paulo, Recife, Distrito Federal e Rio Grande do Sul, caracterizados por quadros clínicos de meningite, peritonite, infecção neonatal, aborto e diarreia (ESPER et al., 1978; LEAL et al., 1983; HOFER et al., 1998; SCHWAB e EDELWEISS, 2003; NORBERG et al., 2005). No entanto, no Brasil, os casos de listeriose são subnotificados em decorrência tanto pela falha no diagnóstico laboratorial quanto pela utilização de antibióticoterapia previamente ao diagnóstico, o que dificulta o isolamento do agente (HOFER et al., 1998).

O relato mais recente da doença no país foi realizado por MARTINS et al. (2010) que descreveram seis casos de listeriose em pacientes idosos em um hospital no Rio de Janeiro. Os pacientes contraíram a infecção durante o período de hospitalização. Os isolados de *L. monocytogenes* destes pacientes foram tipificados por PFGE e os perfis genéticos obtidos apresentaram mais de 80% de similaridade, sugerindo a ocorrência de um surto policlonal. A infecção se originou, provavelmente, a partir da alimentação fornecida pelo hospital; como não foi realizado isolamento bacteriano dos alimentos, esta fonte não foi confirmada. No entanto, após a implantação de melhorias nas condições higiênicas da cozinha, do hospital, não foram detectados novos casos de listeriose.

Apesar de a listeriose humana ser, classicamente, ocasionada por *L. monocytogenes*, já foram relatados casos isolados da doença a partir da infecção por *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (ROCOURT et al., 1986; SNAPIR et al., 2006; GUILLET

et al., 2010). Embora raros, esses casos podem ser compreendidos pela comunidade científica pelo fato de ambas as espécies possuírem genes de virulência semelhantes aos de *L. monocytogenes*.

Há, porém, um relato de caso fatal de bacteremia por *L. innocua* em uma idosa, na França (PERRIN et al., 2003). A paciente, de 62 anos de idade, apresentava quadro clínico de abdômen agudo e estava muito debilitada pela infecção. Na hemocultura foi detectada a presença de bacilos gram-positivos que foram identificados inicialmente por métodos fenotípicos e bioquímicos como *L. monocytogenes*. Após a sorotipificação, a bactéria foi classificada como *L. innocua* sorovar 6a. Os estudos moleculares confirmaram que o isolado pertencia à espécie *L. innocua* (PERRIN et al., 2003). Este primeiro relato de listeriose humana ocasionada por *L. innocua* demanda atenção ao risco que a contaminação ambiental com esta espécie pode representar para a saúde humana.

1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DE *Listeria*

A detecção de *Listeria* spp. pode ser realizada a partir de métodos de cultivo bacteriano, técnicas sorológicas e moleculares. Até hoje o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda que o diagnóstico clínico da listeriose seja confirmado a partir do isolamento do micro-organismo através de cultivo, utilizando meios seletivos para melhorar as taxas de isolamento bacteriano, associado à confirmação pela técnica de coloração de Gram. Os testes sorológicos não são recomendados, pois não são considerados confiáveis (CDC, 2011c). Já o *Food and*

Drug Administration (FDA) determinou na última revisão do *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) os métodos padrão de cultivo seletivo e testes bioquímicos como de escolha para detecção e identificação de *L. monocytogenes* em alimentos, porém, já introduziu metodologias alternativas permitidas que possibilitam agilizar o processo de detecção (HITCHINS e JINNEMAN, 2011).

O cultivo bacteriano é caracterizado pela utilização de meios enriquecidos e suplementados com agentes seletivos, como antimicrobianos que inibem a multiplicação de bactérias gram-negativas e mesmo fungos, e substâncias indicadoras como a esculina para identificar as colônias de *Listeria* sp. As colônias isoladas são submetidas a testes bioquímicos para confirmação de gênero. A diferenciação das espécies de *Listeria* é realizada em meios sólidos com indicadores de hidrólise ocasionada por determinados fatores de virulência, sendo que os mais utilizados são os testes de hemólise e CAMP que detectam a produção da hemolisina, além da prova da lecitinase que evidencia a atividade da fosfolipase B (PC-PLC) (MCLAUHLIN e REES, 2009). Também foi evidenciado o aumento do uso do meio ALOA[®] (*Agar Listeria acc. Ottaviani and Agosti*) que possibilita a detecção da produção da fosfolipase A (PI-PLC) (BELOEIL et al., 2003).

Esses métodos apenas diferenciam as espécies patogênicas (*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*) das não patogênicas (*L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*) pela atividade dos fatores de virulência. No entanto, a distinção fenotípica das espécies pode ser muito complexa e comprometer a identificação destes micro-organismos. SKALKA et al. (1983) já relatavam reações falso-positivas de hemólise em algumas cepas de *L. innocua*; LACHICA (1996) também detectou isolados de *L. monocytogenes* com atividade hemolítica fraca, de

tal forma, que estes poderiam ser erroneamente identificados como *L. innocua*. Dessa forma, os métodos fenotípicos de diferenciação das espécies de *Listeria* estão sujeitos a erro quando utilizados com cepas atípicas.

As técnicas moleculares são alternativas para complementar e certificar a diferenciação e identificação das espécies de *Listeria*. O FDA propõe a utilização de kits comerciais e alguns automatizados para a identificação de espécie, além de sua confirmação pelo PCR em tempo real. Além disso, a ribotipagem e a PFGE são métodos de tipificação molecular indicados para a caracterização epidemiológica dos surtos de listeriose (HITCHINS e JINNEMAN, 2011). A técnica mais rápida para a confirmação das espécies ainda é a reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional. Esta pode ser utilizada para confirmação de gênero, a partir de genes comuns a este como o *iap* e o *prs*, e também para identificação das espécies a partir da pesquisa por genes espécie-específicos.

GLASER et al. (2001) e BUCHRIESER et al. (2003) descreveram diferenças genéticas marcantes entre *L. monocytogenes* e *L. innocua*, desde o tamanho dos respectivos cromossomos até o conteúdo gênico específico de cada espécie, que passaram a ser utilizadas para identificá-las. Neste contexto, destacam-se as regiões do genoma determinantes de mecanismos de virulência, já que classicamente *L. innocua* é caracterizada como não patogênica para os animais e humanos (MCLAUHLIN e REES, 2009) e, portanto, não possui os genes de virulência característicos de *L. monocytogenes*.

Dessa forma, a maioria das técnicas moleculares empregadas na prática laboratorial para distinguir *L. monocytogenes* de *L. innocua* utiliza os genes de virulência de *L. monocytogenes* para a detecção e a identificação de isolados. Além

disso, estes genes também são utilizados como marcadores de patogenicidade para caracterizar cepas de *L. monocytogenes* e isolados atípicos das demais espécies do gênero (BUCHRIESER et al., 2003; JOHNSON et al., 2004; VOLOKHOV et al., 2007; DEN BAKKER et al., 2010).

A partir dos métodos moleculares foi possível caracterizar os isolados atípicos de *L. innocua* que eram fenotipicamente compatíveis com *L. monocytogenes* e que geravam opiniões controversas na comunidade científica alertando para novos riscos à saúde humana. JOHNSON et al. (2004) foram os primeiros a relatar a existência de isolados pertencentes ao gênero *Listeria* com características fenotípicas sugestivas de *L. monocytogenes*, porém, com fraca hemólise. A continuação dos estudos com o teste DIM e a pesquisa de genes de virulência específicos de *L. monocytogenes* e de genes exclusivos de *L. innocua*, resultaram na classificação dos isolados como pertencentes à espécie *L. innocua* com características atípicas de β -hemólise fraca e presença de genes de virulência específicos de *L. monocytogenes*.

VOLOKHOV et al. (2007) continuaram a estudar estas cepas atípicas e relataram a existência dos genes *inlA* e *inlC*, da família das internalinas. Esses resultados auxiliaram na proposição da teoria de que essas cepas representam um estágio da evolução de um ancestral comum entre *L. monocytogenes* e *L. innocua*, que não perdeu todos os genes virulência no evento de especiação, mas sim, acumulou mutações. Como a expressão e o funcionamento dos fatores de virulência dependem das mutações identificadas nos respectivos genes, novos estudos específicos sobre estas mutações e suas consequências são necessários para se determinar a real capacidade patogênica destas cepas de *L. innocua* atípicas para o homem.

Dessa forma, as técnicas moleculares auxiliam na identificação das espécies conjuntamente com os testes fenotípicos. No entanto, estas também devem ser utilizadas com cautela, pois a existência de cepas atípicas de *L. innocua* pode comprometer a triagem. Como os genes mais utilizados para a diferenciação das espécies - *hly*, *plcA* e *inlA* - podem estar presentes em cepas atípicas de *L. innocua* e *L. seeligeri*, seu uso na triagem molecular pode ser contestado.

1.5 FISIOPATOLOGIA

L. monocytogenes tem a capacidade de invadir as células humorais fagocíticas e não fagocíticas, e replicar-se no interior destas e se difundir diretamente de célula a célula (COSSART e LECUIT, 1998). Assim, *L. monocytogenes* é capaz de esquivar da resposta do sistema imune humoral a partir de sua multiplicação intracelular e da resposta celular por sua disseminação através da passagem célula-célula (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A partir do trato gastrointestinal, *L. monocytogenes* pode originar dois quadros clínicos: infecção intestinal não invasiva e infecção invasiva localizada ou sistêmica. O primeiro quadro se caracteriza por gastroenterite febril, enquanto que o segundo pode ocasionar desde infecções focais, como pericardite e artrite, até septicemia (ROBERTS e WIEDMANN, 2003). A forma clássica de infecção por *L. monocytogenes* inicia-se pela disseminação bacteriana a partir da luz intestinal para a corrente sanguínea e, a partir desta, pode atingir o fígado, o baço, o sistema nervoso central e a unidade feto-placentária (Figura 1) (LORBER, 1996).

Dessa forma, a translocação bacteriana depende da invasão do epitélio intestinal por *L. monocytogenes* e posterior colonização de tecidos mais profundos para

alcançar a corrente sanguínea. A invasão ou a internalização do micro-organismo nas células intestinais ocorre por reorganização do seu citoesqueleto, de tal forma que *L. monocytogenes* situa-se em um vacúolo ou fagossomo primário de membrana única. Este deve ser desintegrado para liberar o agente e permitir a sua multiplicação no citoplasma da célula hospedeira. A bactéria, livre no citoplasma, movimenta-se contra a membrana citoplasmática a partir de filamentos de actina, sendo posteriormente envelopada e eliminada da célula numa estrutura semelhante a um vacúolo. Este será englobado pelas células adjacentes formando um fagossomo secundário com dupla membrana. A lise deste vacúolo inicia um novo ciclo da infecção intracelular (COSSART e LECUIT, 1998).

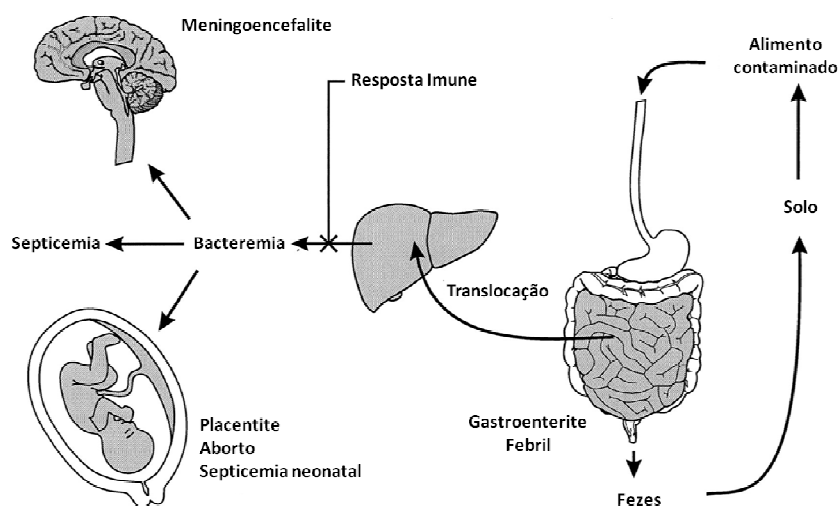


Figura 1 - Representação esquemática da fisiopatologia da infecção por *L. monocytogenes*. Adaptado de: VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001.

O ciclo de infecção intracelular pode ser resumido nas seguintes fases: invasão, escape do fagossomo primário, multiplicação citoplasmática, movimentação intra e intercelular, e escape do fagossomo secundário (Figura 2). Cada uma dessas fases é ocasionada por determinados fatores de virulência produzidos por *L. monocytogenes*. A internalização é induzida por duas proteínas específicas que funcionam como invasinas e que pertencem à família das internalinas. A lise dos fagossomos primário e secundário é realizada pela hemolisina listeriolisina O e pelas fosfolipases A e B. A movimentação intra e intercelular ocorre a partir da formação e organização de filamentos de actina que é determinada pela secreção da proteína ActA. Ainda não foram completamente elucidados os fatores envolvidos na multiplicação intracelular de *L. monocytogenes* (COSSART e LECUIT, 1998; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

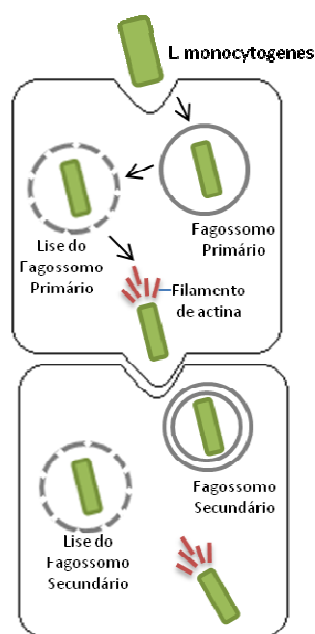


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes*. Adaptado de: HAMON et al., 2006.

1.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Dentre os fatores de virulência existentes em *L. monocytogenes*, destacam-se a hemolisina e as fosfolipases, que são responsáveis pelo escape dos fagossomos, e as internalinas que participam da internalização da bactéria dentre outras ações relativas à patogenicidade de *L. monocytogenes*.

1.6.1 Hemolisina

A hemolisina de *L. monocytogenes* é denominada de listeriolisina O (LLO); trata-se de uma proteína, de aproximadamente 58 kDa, composta por 527 aminoácidos. Esta é classificada como uma citolisina pertencente à família das toxinas formadoras de poros colesterol dependentes (CDTX), que é ativa em baixos valores de pH (4,5 a 6,5) e determina a capacidade hemolítica da bactéria (LIU et al., 2007). A LLO é considerada um dos principais determinantes da patogenicidade de *L. monocytogenes*, de tal forma que foi estabelecida forte correlação entre a capacidade hemolítica das cepas e seu potencial patogênico (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O principal papel da LLO é a lise da membrana dos fagossomos primário e secundário para liberar o agente e permitir a sua multiplicação no citoplasma da célula hospedeira. A dissolução da membrana do fagossomo ocorre a partir da formação de poros ou lesões, sendo que a toxina é ativa apenas contra membranas compostas por colesterol (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A listeriolisina O é codificada pelo gene *hly*. Este foi o primeiro gene de virulência de *L. monocytogenes* que foi identificado e sequenciado (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Trata-se de um gene cromossômico, cuja sequência

apresenta um tamanho de 1.590 pares de bases (pb) (LIU et al., 2007). O gene *hly* é o principal determinante de patogenicidade das cepas de *L. monocytogenes*, uma vez que as cepas que apresentam mutações neste gene são caracterizadas como não patogênicas pelo fato de mostrarem-se avirulentas em modelos de infecção experimental com murinos (PORTNOY et al., 1992).

A atividade hemolítica é evidenciada com o cultivo das cepas de *Listeria* em ágar sangue com a produção de β -hemólise. Dessa forma, as cepas hemolíticas são caracterizadas pela formação de um halo mais claro ao redor das colônias (Figura 3). A semeadura em ágar sangue é uma das provas fenotípicas de caracterização de *Listeria*, sendo que *L. monocytogenes* produz hemólise evidente enquanto que *L. innocua* é considerada não hemolítica por não possuir o gene *hly*.

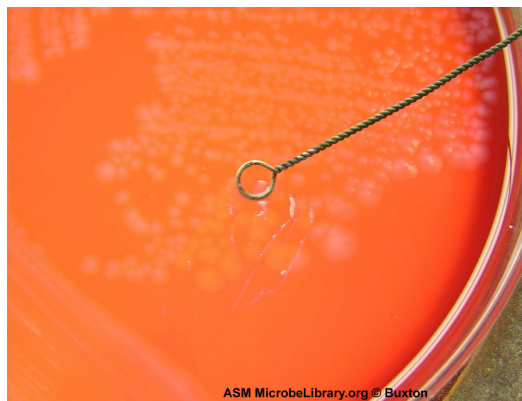


Figura 3 - Cultura de *L. monocytogenes* em ágar sangue de carneiro evidenciando os halos de β -hemólise ao redor e embaixo das colônias. Extraído de: ASM - Rebecca Buxton, University of Utah.

1.6.2 Fosfolipases

L. monocytogenes produz dois tipos de enzima com atividade de fosfolipase C: a fosfolipase A (PlcA) e a fosfolipase B (PlcB). Ambas atuam como fatores de virulência auxiliando a listeriolisina O na lise da membrana dos fagossomos primário e secundário. As fosfolipases diferem em relação aos respectivos tamanhos, alvos ou substratos e nas formas enzimáticas nas quais são secretadas (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A fosfolipase A (PlcA), classicamente denominada como fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC), apresenta atividade proteolítica específica para membranas contendo fosfatidilinositol (GOLDFINE e KNOB, 1992). Trata-se de uma proteína de 33 kDa, composta por 317 aminoácidos, que é secretada por *L. monocytogenes* em forma já ativa (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU et al., 2007). Esta é considerada como um fator de virulência acessório, pois atua auxiliando a hemolisina LLO e a fosfolipase B na lise da membrana do fagossomo (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A PlcA é codificada pelo gene cromossômico *plcA*, que apresenta um tamanho de 954 pb e localiza-se adjacente ao gene *hly* (LIU et al., 2007).

A fosfolipase B (PlcB), também denominada de fosfatidilcolina fosfolipase C (PC-PLC), não é tão específica quanto a PlcA exibindo atividade proteolítica a um amplo espectro de componentes da membrana, como a fosfatidilcolina, a fosfatidiletilonamina, a fosfatidilserina e até mesmo a esfingomiélna (GOLDFINE et al., 1993). A PlcB também participa da lise da membrana dos fagossomos primário e secundário conjuntamente com a LLO e a PlcA. No entanto, esta é secretada na forma de pró-enzima inativa para evitar danos à membrana bacteriana pela degradação de seus fosfolipídios (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU et al.,

2007). Dessa forma, a PlcB necessita de ativação citoplasmática por clivagem proteolítica pela enzima metaloprotease.

A fosfolipase B é uma enzima zinco dependente com massa molecular de, aproximadamente, 29 kDa e apresenta sequência de 289 aminoácidos semelhante à fosfatidilcolina fosfolipase C do *B. cereus* e do *C. perfringens* (PORTNOY et al., 1992; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A PlcB é codificada pelo gene cromossômico *plcB* que também está localizado nas proximidades dos genes *hly* e *plcA*, e apresenta uma sequência de 954 pb (LIU et al., 2007).

A produção da PlcB, consequente à expressão do *plcB*, é utilizada como uma prova fenotípica (prova da lecitinase) para caracterizar as espécies de *Listeria*, pois esta ocasiona o aparecimento de um halo opaco ao redor das colônias bacterianas cultivadas em ágar contendo gema de ovo (PORTNOY et al., 1992; CRUZ et al., 2008a). Esta propriedade é também explorada pelos meios de cultura cromogênicos que utilizam a prova da lecitinase para diferenciar as espécies patogênicas de *Listeria*, já que estas possuem o gene *plcB*.

1.6.3 Internalinas

As internalinas são proteínas com atividade de invasinas, de tal forma que induzem a internalização de *L. monocytogenes* por células epiteliais não fagocíticas (CAMPOS, 2004). Trata-se de proteínas de superfície que possuem repetidos resíduos ricos em leucina (*leucine-rich repeats* - LRR) que se fixam com intensidade variada à superfície bacteriana (COSSART et al., 2003). Dentre as 25 internalinas identificadas até o momento, a internalina A (InlA) e a internalina B (InlB) são as

mais estudadas, pois são as responsáveis pelo processo de internalização de *L. monocytogenes* (LIU et al., 2007).

A InlA é uma proteína de superfície de 88 kDa, composta por 800 aminoácidos, que interage com a proteína de adesão E-caderina presente na superfície das células epiteliais intestinais humanas (MENGAUD et al., 1996). Esta interação é espécie específica, o que explica a impossibilidade de se reproduzir a infecção oral nos modelos de experimentação animal (BIERNE et al., 2007). A InlA interage com o domínio extracelular da E-caderina, promove a adesão da bactéria à célula epitelial e induz o processo de rearranjo do citoesqueleto, que resulta na fagocitose do patógeno pela célula hospedeira, caracterizando a fase de internalização do ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes* (CAMPOS, 2004; LIU et al., 2007).

A InlB é responsável pela internalização de *L. monocytogenes* em células não-epiteliais, como hepatócitos, fibroblastos e células endoteliais (CAMPOS, 2004). Isto ocorre pelo fato de a InlB interagir com distintas proteínas receptoras das células hospedeiras tal como o fator de crescimento de hepatócitos (Met), o receptor do componente C1q do sistema complemento (C1qR) e as glicosaminoglicanas (BRAUN et al., 1998). A InlB é composta por 630 aminoácidos com massa molecular igual a 65 kDa e, ao contrário da InlA, se liga fracamente à superfície bacteriana por meio de ligação não-covalente. A interação da InlB com os receptores de superfície das células hospedeiras induz o processo de rearranjo dos filamentos de actina que resulta na internalização de *L. monocytogenes* (BIERNE e COSSART, 2002).

A InlA é codificada pelo gene cromossômico *inlA* que apresenta uma sequência de 2.403 pb e que se localiza adjacente ao gene *inlB*, de 1.893 pb, cuja expressão

resulta na produção da InlB (LIU et al., 2007). Ambos os genes compõem o *operon inlAB*, de tal forma que estão funcionalmente relacionados e são expressos e controlados conjunta e coordenadamente. A introdução do *operon* ou de um dos genes que o compõem em espécies não patogênicas, como *L. innocua*, confere a estas a habilidade de invadir células hospedeiras (PORTNOY et al., 1992). Por serem importantes fatores de virulência determinantes da primeira fase da infecção intracelular, os genes *inlA* e *inlB* são utilizados como triagem na caracterização molecular de cepas de *Listeria* sp.

Além da InlA e da InlB, outras proteínas da família das internalinas também apresentam importante papel nos estágios pós-intestinais da infecção por *L. monocytogenes*, porém estas não apresentam atividade de invasinas (BIERNE et al., 2007; LIU et al., 2007). Dentre as demais internalinas destacam-se a InlC, também denominada de IrpA, e a InlJ, anteriormente designada de Im2821, cuja participação na determinação da virulência de *L. monocytogenes* foi detectada a partir da deleção de ambos genes e consequente aumento da dose letal média (DL50) em experimentos com camundongos (ENGELBRECHT et al., 1996).

A InlC é uma internalina pequena secretada pela bactéria e que está envolvida no processo ativo de movimentação intercelular (BIERNE et al., 2007). Trata-se de uma proteína de 30 kDa, composta por 297 aminoácidos e codificada pelo gene *inlC*. Além de promover a difusão intercelular do patógeno, a partir da regulação do processo de formação de protrusões da membrana celular (RAJABIAN et al., 2009), a InlC também é um dos principais alvos da resposta imune humoral humana contra *L. monocytogenes* (GRENNINGLOH et al., 1997). No entanto, esta não interfere nas fases de invasão e replicação intracelular da bactéria (RAJABIAN et al., 2009).

A InlJ difere das demais proteínas desta família por possuir resíduos de cisteína nas regiões ricas em leucina (LRR) que caracterizam as internalinas (BIERNE et al., 2007). O gene codificador desta proteína, *inlJ*, é considerado como conservado no genoma de cepas de *L. monocytogenes* e ausente no restante das espécies do gênero (DOUMITH et al., 2004). Trata-se de uma proteína de 851 aminoácidos detectada exclusivamente em cepas virulentas de *L. monocytogenes* (LIU et al., 2003). Embora ainda não se conheça a função da InlJ, por sua importância na determinação da virulência de *L. monocytogenes*, utiliza-se seu respectivo gene *inlJ* como marcador na triagem molecular para a caracterização da patogenicidade dos isolados (LIU et al., 2003; 2007).

1.7 ORGANIZAÇÃO GENÉTICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA E O FATOR REGULADOR POSITIVO

Os genes que codificam os fatores de virulência PlcA, LLO e PlcB localizam-se adjacentes um dos outros, originando um agrupamento ou um *cluster* de genes de virulência de 9,6 kb, denominado de região central de virulência, mais conhecida como LIPI-1 (Ilha de Patogenicidade de *Listeria* 1 - *Listeria Pathogenicity Island 1*). A LIPI-1 é composta por seis genes, incluindo os genes *plcA*, *hly* e *plcB*, além dos genes codificadores de outros fatores de virulência, ActA e Mpl, e do Fator Regulador Positivo (PrfA) (COSSART e LECUIT, 1998; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A LIPI-1 é organizada de forma que o gene *hly* destaca-se em posição central com dois *operons* em seus extremos, o da lecitinase formado pelos genes *mpl*, *actA* e

plcB, e o operon *plcA-prfA*. Tanto o gene *hly* quanto o operon da lecitinase são transcritos no mesmo sentido, enquanto que o operon *plcA-prfA* é transcrito na direção oposta (Figura 4) (KREFT e VAZQUEZ-BOLAND, 2001).

As internalinas, por sua vez, organizam-se em ilhas compostas por dois ou mais genes que são transcritos na mesma direção. Uma das únicas exceções é o gene *inlC* que encontra-se isolado do restante das internalinas em uma ilha própria. Como descrito anteriormente, os genes mais estudados desta família são o *inlA* e o *inlB* que se organizam em um operon, denominado operon *inlAB*, que é considerado um dos principais marcadores de virulência das cepas de *L. monocytogenes*. De forma semelhante à LIPI-1, o operon *inlAB* e o gene *inlC* também são regulados pelo Fator Regulador Positivo (PrfA) (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O PrfA é uma proteína de 27 kDa, composta por 237 aminoácidos, codificada pelo gene pleiotrópico *prfA*. Este, por sua vez, localiza-se em um dos extremos da LIPI-1, adjacente ao gene *plcA*, e apresenta uma sequência de 714 pb (LIU et al., 2007). O PrfA é o principal regulador da virulência de *L. monocytogenes* que promove a ativação da expressão dos genes de virulência da LIPI-1 e das internalinas A, B e C, além de controlar sua própria expressão por um sistema de retroalimentação negativa (Figura 4) (FREITAG et al., 1993). A ativação da expressão ocorre a partir da ligação do PrfA em uma sequência palindrômica de 14 pb, localizada 40 pb antes do sítio de iniciação transcricional dos genes regulados pelo PrfA, denominada *box PfrA* (KREFT e VAZQUEZ-BOLAND, 2001; SCORTTI et al., 2007).

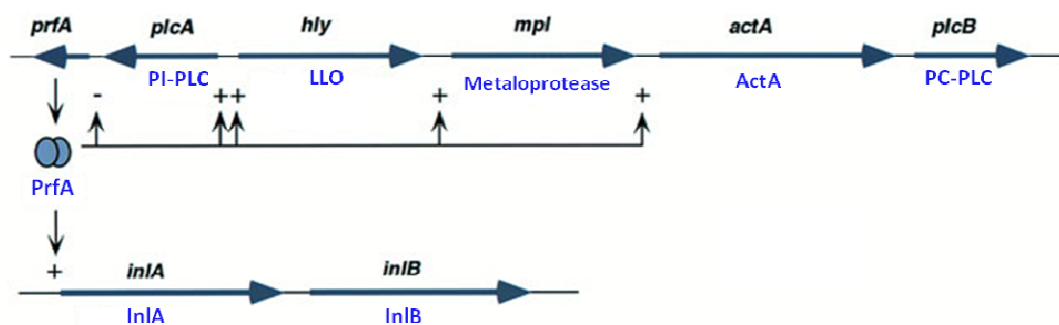


Figura 4 - Representação esquemática da LIPI-1 e operon *inlAB*. As setas finas pretas indicam a atuação do PrfA, ativação (+) ou inibição (-), sobre os genes de virulência. Adaptado de: COSSART e LECUIT, 1998.

Atualmente, acredita-se que o mecanismo de ação do PrfA inclui um cofator de baixo peso molecular que pode variar conforme as condições ambientais (SCORTTI et al., 2007; FREITAG et al., 2009). O ambiente modula a expressão do PrfA a partir de alterações na temperatura, condições de estresse, captura de substâncias químicas do meio extracelular, contato com células eucarióticas e o próprio ambiente citoplasmático da célula hospedeira. Estas variações ambientais promovem a ativação do PrfA, anteriormente inativo ou com baixa atividade, ocasionando a transcrição dos genes de virulência. Dessa forma, a ativação do PrfA transforma *L. monocytogenes* de um micro-organismo saprofítico em um patógeno intracelular (CRUZ et al., 2008a; FREITAG et al., 2009).

Assim, foi proposta a teoria do “*outside-to-inside switch*”, na qual, acredita-se que *L. monocytogenes*, em ambiente extracelular, apresenta o PrfA em condições de baixa atividade e, conseqüentemente, baixos níveis de expressão dos genes de virulência. Uma vez situada no ambiente intracelular, há ativação do PrfA que induz maiores níveis de expressão dos fatores de virulência tornando a bactéria um patógeno (FREITAG et al., 2009). Um dos principais sinais para a ativação do PrfA,

e consequente mudança do caráter patogênico de *L. monocytogenes*, são os nutrientes disponíveis no meio no qual a bactéria se encontra. Dessa forma, as fontes de carbono e as vias metabólicas utilizadas podem ocasionar a inibição ou a ativação da produção do PrfA (CHICO-CALERO et al., 2002; FREITAG et al., 2009).

Por causa dessa capacidade de se transformar em um patógeno intracelular, o isolamento de *L. monocytogenes* no ambiente e nos alimentos apresenta risco para a saúde humana, de tal forma, que este não é tolerado pelas normas higiênico-sanitárias de muitos países, incluindo o Brasil, especialmente para produtos lácteos (ANVISA, 2001).

1.8 DIVERSIDADE NA VIRULÊNCIA

Além da ativação do PrfA, ocasionando a mudança para o estado patogênico, a virulência de *L. monocytogenes* pode variar entre as cepas. WIEDMANN et al. (1997) afirmaram que dentre as linhagens de *L. monocytogenes*, as cepas da linhagem I, pertencentes aos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, e 4e, são as causadoras dos surtos de listeriose e, portanto, são as únicas consideradas como de importância para a saúde pública. No entanto, já foram descritos casos de listeriose pelo sorotipo 1/2a, contrariando a afirmação acima (LEMES–MARQUES et al., 2007; FRETZ et al., 2010; CDC, 2011b).

Também já foram isoladas cepas de *L. monocytogenes* com acentuada virulência (RIPIO et al., 1997; WONG e FREITAG, 2004; MINER et al., 2008), assim como cepas de *L. innocua* com atividade hemolítica atípica e com presença de genes de virulência como o *hly* e o *inlA* (JOHNSON et al., 2004; VOLOKHOV et al., 2007).

De forma semelhante, foram detectados isolados de *L. monocytogenes* com baixa virulência em alimentos, ambiente e material clínico humano (ROCHE et al., 2005; TÉMOIN et al., 2008).

Os isolados de *L. monocytogenes* com virulência distinta, seja esta exacerbada ou reduzida, são caracterizados por mutações pontuais nos genes de virulência. No primeiro caso, foram descritas mutações no gene *prfA* que promovem a ativação constitutiva deste e, assim, acentuam a ação do PrfA com conseqüente aumento da expressão dos genes de virulência (RIPIO et al., 1997; WONG e FREITAG, 2004; MINER et al., 2008; FREITAG et al., 2009). Já, em relação às cepas com baixa virulência, esta é decorrente de mutações nos genes de virulência comprometendo a expressão dos respectivos fatores ou sua atividade, quando estes são secretados como proteínas truncadas, por exemplo. Os principais genes acometidos por estas mutações pertencem à LIPI-1, como o *plcB* e o *plcA*, e ao operon *inlAB* (ROCHE et al., 2005; TÉMOIN et al., 2008; ROCHE et al., 2009).

Os isolados de *L. innocua* atípicos, com atividade hemolítica, são caracterizados pela presença de alguns genes de virulência de *L. monocytogenes* (*hly*, *plcA*, *plcB*, *inlA* e *inlC*) com algumas mutações pontuais, de tal forma, que podem expressar os fatores de virulência e até se replicar em células hospedeiras, porém não são capazes de completar o ciclo de infecção intracelular (JOHNSON et al., 2004; VOLOKHOV et al., 2007). A presença destes genes de distintas localizações genômicas, sugere que estes genes não sejam transferidos de forma horizontal, por elementos móveis entre as espécies, mas sim, que representem um estágio da evolução de um ancestral comum de *L. monocytogenes* e de *L. innocua* (VOLOKHOV et al., 2007).

O achado dessas cepas atípicas de *L. innocua*, com genes de virulência de *L. monocytogenes*, pode ser uma das explicações para o caso fatal de listeriose ocasionado por *L. innocua*, na França (VOLOKHOV et al., 2007). Considerando que *L. innocua* era classicamente caracterizada como não virulenta para os animais e o homem, atualmente, esta espécie deve receber mais atenção da comunidade científica pelo seu potencial patogênico e por seu amplo isolamento em distintas fontes de alimento e ambiente.

De forma semelhante, a diversidade da virulência das cepas de *L. monocytogenes* instiga os pesquisadores a buscar a sua origem e a sua importância para a saúde humana. Assim, estudos de análise genômica, transcriptômica e, até mesmo, proteômica estão sendo desenvolvidos com essas cepas, além da pesquisa por novos fatores de virulência que podem participar do ciclo de infecção intracelular de *L. monocytogenes*, a fim de aumentar ainda mais o conhecimento sobre este patógeno, visando a proteção da população.

1.9 HISTÓRIA DAS CEPAS DO PRESENTE ESTUDO

As cepas ambientais e de alimento (carne suína) estudadas neste trabalho foram isoladas a partir de 12 coletas realizadas entre Maio de 2007 a Abril de 2008, durante o trabalho de doutoramento de PAIXÃO (2010) no Laboratório de Sanidade Suína, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. No estudo de PAIXÃO (2010), foram analisadas amostras de ambiente de dois abatedouros de suínos (parede, piso e mesa da sala de abate; parede e piso da câmara fria) e de dois mercados de carne (parede, piso e mesa) do Estado de São Paulo. Também foram estudadas amostras de cortes de carne suína comercializada nestes mercados e proveniente de carcaças originárias dos abatedouros previamente analisados. Os isolados de casos clínicos de humanos foram cedidos pelo Doutor Ernesto Hofer, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ). Estas cepas foram isoladas nos últimos 30 anos em São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Distrito Federal e Pernambuco.

Além do isolamento e da caracterização fenotípica (testes bioquímicos e sorotipificação), realizados em conjunto pelo Laboratório de Sanidade Suína (FMVZ – USP) e pelo Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), as cepas obtidas também foram genotipadas pelos métodos de tipificação molecular PFGE, AFLP e ERIC-PCR. Nestes, os isolados ambientais apresentaram alta similaridade genética (acima de 85%) com as cepas de *L. monocytogenes* originárias de infecção humana, sendo que determinadas cepas ambientais e alimentares exibiram perfis genotípicos idênticos às humanas. Esses resultados despertaram o interesse pelo potencial patogênico desses isolados de ambiente e carne.

2. JUSTIFICATIVA

A bactéria *Listeria monocytogenes* é um agente zoonótico, potencialmente letal, transmitido, principalmente, por alimentos. Dentre as fontes de contaminação de *L. monocytogenes*, destacam-se os produtos de origem láctea, carnes e embutidos, além dos ambientes da indústria de processamento alimentício. Na maioria dos países nos quais foi detectada a contaminação com *L. monocytogenes* e a ocorrência de listeriose humana, a ligação epidemiológica entre amostras de ambiente, animal, alimento e humana já foi estabelecida.

No Brasil, já foram descritos casos de infecção em humanos por *L. monocytogenes*, resultando em abortos e, muitas vezes, mortes em crianças e adultos. Estudos visando determinar a frequência do agente em abatedouros e açougues já foram iniciados no país, sendo detectada a presença do mesmo em carne suína além de outros produtos embutidos. Juntamente com *L. monocytogenes*, isolados de *L. innocua* foram detectados com características fenotípicas e genéticas semelhantes.

Na última década, foram isoladas, na Europa e na América do Norte, cepas de *L. monocytogenes*, em ambiente e alimento, com potenciais patogênicos distintos. Isolados ambientais considerados anteriormente como não patogênicos para o homem, atualmente, já são identificados com baixa a alta virulência para células eucarióticas e apresentam mutações nos genes de virulência que podem ser responsáveis pelos diferentes perfis de patogenicidade desses isolados.

De forma semelhante, o relato de um caso fatal de listeriose humana ocasionada por *L. innocua* demanda atenção para o isolamento de cepas atípicas de *L. innocua* com genes de virulência específicos de *L. monocytogenes*, que podem proporcionar para essas cepas patogenicidade. Este novo cenário, com alteração da virulência de

ambas as espécies, apresenta maior risco à saúde da população exposta a estes ambientes e alimentos sendo, portanto, uma importante questão de saúde pública.

O estudo da epidemiologia molecular destas espécies, no Brasil, sugere grande similaridade entre os isolados de ambiente e alimentos com as amostras de infecção humana. Além disso, já foram isoladas, no país, cepas de *L. monocytogenes* com fenótipo atípico (fraca atividade hemolítica) e cepas de *L. innocua* que apresentam genes de virulência específicos de *L. monocytogenes*. Esses achados indicam possíveis mutações nos genes de virulência dessas cepas e, em consequência, o aumento do seu potencial patogênico para o homem.

Visando contribuir para o entendimento da ocorrência dos isolados com virulência atípica e os mecanismos genéticos envolvidos, o presente estudo propõe a detecção, confirmação e mapeamento dos genes de virulência existentes em cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, originárias de carne suína e ambientes de abatedouros e açougues; os genes detectados serão analisados em busca de mutações que determinem alteração, na estrutura ou mesmo na produção, de suas respectivas enzimas e, conseqüentemente, do seu potencial patogênico para o homem.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* isoladas em pontos da linha de abate suíno e do comércio de carne no Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Pesquisar genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes*, com atividade hemolítica atípica, isoladas de carne suína e ambientes de abatedouros e açougues.

2. Pesquisar genes de virulência associados à patogenicidade de *L. monocytogenes* em cepas de *Listeria innocua* isoladas de ambientes de abatedouros de suínos e açougues, e que, inicialmente, apresentaram o gene de virulência *hly*.

3. Mapear os genes de virulência detectados nas cepas estudadas.

4. Comparar os resultados do sequenciamento com sequências disponíveis no banco de dados GenBank e com a literatura científica, em busca de possíveis mutações nos genes de virulência.

5. Comparar os resultados do sequenciamento das cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* atípicas com as sequências das cepas de origem humana e as cepas padrão.

6. Propor novos iniciadores para diferenciação molecular dos isolados de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram utilizadas, neste estudo, cepas da coleção de cultura do Laboratório de Sanidade Suína, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e do Laboratório de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz. Foram analisadas 40 cepas, sendo 25 originárias de amostras de carne suína e de ambientes de abatedouros e açougues (13 isolados de *L. monocytogenes* e 12 de *L. innocua*), 11 cepas provenientes de infecção humana, dois controles de *L. monocytogenes* (ATCC 19115 e ATCC 19111) e dois de *L. innocua* (ATCC 33090 e CLIP 12612). Dessa forma, o estudo partiu das seguintes amostras:

- 9 cepas de *L. monocytogenes* de carne suína e ambientes de dois abatedouros de suínos e açougues do Estado de São Paulo, identificadas por métodos fenotípicos e sorotipificadas. Estes isolados apresentam alta similaridade genética com as cepas de *L. monocytogenes* originárias de infecção humana, segundo a análise do perfil eletroforético obtido através dos métodos de tipificação molecular AFLP, ERIC-PCR e PFGE.

- 4 cepas de *L. monocytogenes*, isoladas conjuntamente com as cepas citadas acima, que apresentaram atividade hemolítica fraca em ágar sangue de carneiro 5%.

- 7 cepas de *L. innocua* sorotipo 6a, isoladas junto com as cepas de *L. monocytogenes* citadas acima, que apresentaram perfil fenotípico semelhante ao das anteriores e resultado positivo para o PCR do gene de virulência *hly*.

- 5 cepas de *L. innocua* sorotipo 6a, isoladas de ambientes de abatedouro de suínos no Estado de São Paulo, com perfil fenotípico e sorológico característico de *L. innocua*.

- 11 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes com listeriose, nos últimos 30 anos, em distintos Estados do Brasil (São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Distrito Federal e Pernambuco). Estas foram previamente identificadas por testes bioquímicos complementados pela sorotipificação e identificação molecular com reação de PCR espécie-específica. Uma destas cepas apresentou resultado fraco para hemólise e ausência de halo em meio ALOA®.

- As cepas *L. monocytogenes* ATCC 19115 e ATCC 19111 e *L. innocua* ATCC 33090 e CLIP 12612 também foram utilizadas para controle do experimento.

4.2 REISOLAMENTO

As cepas encontravam-se armazenadas em freezer -80°C em glicerol. Uma alíquota foi retirada do meio de armazenamento e semeada em Caldo de Enriquecimento de *Listeria* - LEB (Oxoid) e incubada por 24 a 48 horas a 37°C, para ativação e multiplicação dos isolados. Após este período, aproximadamente, 10 µL do caldo foi semeado em ágar soja triptona – TSA (Himedia), suplementado com 0,6% de extrato de levedura, para confirmação de colônias puras. As placas foram incubadas a 35-37°C durante 24 horas.

4.3 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DA FOSFOLIPASE A (PI-PLC)

Para avaliar a produção da fosfolipase A (PI-PLC), as cepas foram semeadas no meio ágar *Listeria* acc. Ottaviani & Agosti - ALOA[®] (BioCen) e incubadas por 24 horas a 37°C. A multiplicação bacteriana no meio ALOA[®] foi evidenciada pela coloração azul das colônias de *Listeria* sp. e pelo o aparecimento de um halo opaco ao redor das colônias de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* pela ação da PI-PLC.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

A atividade hemolítica das cepas de *Listeria* spp. foi avaliada por meio de inoculação, por picada, em placas de ágar Muller Hinton (Difco) suplementadas com sangue inteiro de carneiro a 5% e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (HITCHINS e JINNEMAN, 2011). As placas foram avaliadas quanto à presença de zonas de clareamento ao redor das colônias bacterianas caracterizando ocorrência de hemólise.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

A extração de DNA genômico das cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* foi realizada por meio do protocolo CTAB (Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio) de acordo com o preconizado por MURRAY e THOMPSON (1980), e descrito por AUSUBEL et al. (1995).

4.6 PESQUISA DOS GENES DE VIRULÊNCIA

A pesquisa dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *plcA*, *hly* e *plcB* foi realizada por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) utilizando o DNA

extraído e os iniciadores descritos no Quadro 1. As reações e os programas para as PCRs foram realizados de acordo com cada iniciador e seguindo as recomendações dos autores, utilizando um termociclador *Mastercycler gradient Eppendorf*[®]. Para cada reação, com um volume final de 25 µL, utilizou-se: 5 µL de DNA genômico, água MilliQ[®] estéril, tampão de reação 10X; 1,5 mM cloreto de Magnésio; 200 µM de dNTPs (Fermentas); 200 µM de cada um dos iniciadores; 1,25 U de Taq-DNA-polimerase (Promega).

Foram desenvolvidos novos iniciadores específicos para as amostras analisadas, quando estas não apresentaram alinhamento genético com os iniciadores descritos acima. Isto foi realizado com base nas sequências disponíveis no banco de dados GenBank, incluindo *L. monocytogenes* EGD-e e F2365. As cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 e ATCC 19111 e *L. innocua* ATCC 33090 e CLIP 12612, além dos isolados de *L. monocytogenes* originários de infecção humana, foram utilizados como controle para as PCRs.

4.7 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rRNA E *prs*

Para a identificação das espécies do gênero *Listeria* foi proposta a amplificação parcial do gene *prs*. Dessa forma, foram utilizados os iniciadores propostos por DOUMITH et al. (2004) para amplificação de um fragmento gênico de, aproximadamente, 370 pb nas cepas *Lm28 – 31*, *Lm4 – 9* e *Lm33*, além dos isolados padrão *Lm10*, *Lm11*, *Lm15* e *Lm46* (Tabela 2). Para complementar estes resultados e confirmar a identificação das espécies de *Listeria*, decidiu-se por realizar a amplificação completa do gene 16S rRNA. Para tanto foram utilizados os iniciadores

propostos por THOMPSON et al. (2001). Esses fragmentos gênicos foram purificados e encaminhados para sequenciamento para posterior análise filogenética.

Quadro 1 - Lista de iniciadores empregados para a pesquisa dos genes de virulência.

Gene	Iniciadores (5' - 3')	Produtos	Referências
<i>inlA</i>	CTCGAGCTCAGGAACAATTCGTGGGGAGC CTCGGATCCACTTCCTTCTTGGGTTGTGC	2649 pb	TEMOIN et al., 2008
<i>inlB</i>	CTCGAGCTCTAGCAGTAGGAACTGCAATGGC CTCGGATCCCGTTGTTTAAATTAGCACATCG	2111 pb	TEMOIN et al., 2008
<i>inlAB</i>	CTTCAGGCGGATAGATTAGG TTCGCAAGTGAGCTTACGTC	902 pb	JUNG et al., 2003
<i>inlC</i>	AATTCCCACAGGACACAACC CGGGAATGCAATTTTTCACTA	517 pb	LIU et al., 2007
<i>inlJ</i>	TGTAACCCCGCTTACACAGTT AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238 pb	LIU et al., 2007
<i>prfA</i>	CGAAACTGCTGGTGCAACTA AACCAATGGGATCCACAAGA	1206 pb	JOHNSON et al., 2004
<i>plcA</i>	CTCGTGAGCTTTGTGATACC GATTGGCGTCTTAGGACTTGCAGG	1773 pb	ROCHE et al., 2005
<i>hly</i>	CGAAACTGCTGGTGCAACTA GCTTTTACGAGAGCACCTGG	3156 pb	JOHNSON et al., 2004
<i>plcB</i>	ATTGGCGTGTTCTCTTTAGG TTAATACGGAACATAACGCG	1103 pb	ROCHE et al., 2005

4.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Para visualização dos produtos obtidos nas reações de PCR, estes foram submetidos à eletroforese (6 V/cm) em gel de agarose 1,2% preparado com o tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1X) e corado com brometo de etídio (1 µg/mL). Ao final da corrida os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta através do equipamento Epi Chemi II Darkroom e software Labworks (UVP). Os fragmentos foram comparados ao marcador de pares de bases 1Kb Plus DNA Ladder[®] (Fermentas).

4.9 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Após a avaliação em gel de agarose, os produtos amplificados das regiões de interesse foram purificados para sua utilização na reação de sequenciamento. Os fragmentos obtidos a partir da PCR foram purificados com o kit “Illustra GFX[™] PCR DNA and Gel Band Purification” (*GE Healthcare*), seguindo as recomendações do fabricante.

4.10 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento direto para a confirmação dos fragmentos amplificados foi realizado, por empresa externa especializada, a partir dos produtos de PCR purificados. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit “BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (*Applied Biosystems*). O material foi analisado no equipamento de sequenciamento automático modelo 3130xl (*Applied Biosystems*). Foram feitas duplicatas de cada amostra para a obtenção de sequências consenso.

4.11 MAPEAMENTO DOS GENES DE VIRULÊNCIA E ANÁLISE DOS RESULTADOS

As sequências obtidas foram editadas e alinhadas manualmente utilizando o programa *BIOEDIT Sequence Alignment Editor 7.0.9* (HALL, 1999) para a obtenção de sequências consenso. Os produtos de sequenciamento editados foram comparados por alinhamento manual e pelo aplicativo *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994) com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank. Esta comparação foi realizada especificamente com as sequências publicadas por JOHNSON et al. (2004) e VOLOKHOV et al. (2007) para análise dos isolados de *L. innocua* e com as sequências descritas por ROCHE et al. (2005), TEMOIN et al. (2008) e ROCHE et al. (2009) para a análise dos isolados de *L. monocytogenes*, procurando-se identificar mutações nos genes de virulência dessas cepas.

As sequências nucleotídicas obtidas foram traduzidas para as sequências de aminoácidos correspondentes a partir do aplicativo *Translate Nucleotide* do programa *BIOEDIT Sequence Alignment Editor 7.0.9* (HALL, 1999). Dessa forma, as sequências de aminoácidos foram avaliadas de modo a identificar as mudanças na composição de suas respectivas proteínas que possam determinar a perda ou a alteração de suas funções.

Foram utilizadas, para a análise comparativa, sequências previamente publicadas e retiradas do banco de dados GenBank, incluindo as sequências dos genes de virulência da cepa padrão *L. monocytogenes* EGD-e e das cepas mutantes de *L. monocytogenes* 08-5578, 08-5923, A23, CNL895795, CNL895807, SLCC2378, SLCC2540 e SLCC5850 (Anexo 3). Estas sequências também foram utilizadas para análise comparativa das estruturas secundárias das respectivas proteínas.

4.12 IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS PROTEICOS

A identificação dos domínios proteicos foi realizada a partir das sequências padrão dos fatores de virulência, utilizando a ferramenta *PROSITE database* (SIGRIST et al., 2010) do servidor ExPASy (*SIB Swiss Institute of Bioinformatics*). Posteriormente, comparou-se a localização desses domínios com a das mutações detectadas nas sequências estudadas.

4.13 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS

A predição da estrutura secundária das proteínas foi realizada a partir do servidor *PSIPRED Server* (BUCHAN et al., 2010), disponibilizado pela *University College London*. Para tanto, as sequências de aminoácidos das cepas atípicas e dos isolados utilizados como controle foram submetidas ao servidor utilizando o *PSIPRED secondary structure prediction method - PSIPRED 3.0* (JONES, 1999). As estruturas resultantes foram comparadas visualmente em busca de alterações na sua composição.

4.14 ANÁLISE FILOGENÉTICA DOS GENES 16S rRNA E *prs*

Os fragmentos amplificados referentes aos genes 16S rRNA e *prs* foram encaminhados para sequenciamento e comparados com sequências previamente publicadas e retiradas do banco de dados Genbank de 16S rRNA e *prs* de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* (Anexo 3), para confirmação de espécie das cepas estudadas. As sequências nucleotídicas obtidas foram utilizadas para a análise filogenética a

partir do programa Mega 5.10 (TAMURA et al., 2011). Para a construção do dendrograma referente à análise da sequência parcial do gene *prs* foi utilizado o método de *Minimum Evolution* (RZHETSKY e NEI, 1992) e o modelo *Tamura-3-parameter* (TAMURA, 1992). O dendrograma obtido da análise da sequência completa do 16S rRNA foi construído utilizando o método de *Maximum-likelihood* (FELSENSTEIN, 1981) e o modelo *Tamura-3-parameter* (TAMURA, 1992).

5. RESULTADOS

5.1 CEPAS BACTERIANAS

Foram estudadas 40 cepas de *Listeria*, sendo 26 de *L. monocytogenes* e 14 de *L. innocua*. Todas as cepas de *L. innocua* pertencem ao sorotipo 6a, enquanto que a maioria das cepas de *L. monocytogenes* (40,0%) pertence ao sorotipo 1/2a. Na Tabela 1 são apresentadas as distribuições das cepas por origem, espécie e sorotipo.

Tabela 1 - Distribuição das cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* segundo origem e sorotipo – N (%).

Origem	<i>L. monocytogenes</i>			<i>L. innocua</i>	Total*
	1/2a	1/2b	4b	6a	
Abatedouro 1	7 (43,8)	1 (50,0)	0	5 (41,7)	13 (36,1)
Abatedouro 2	0	0	0	4 (33,3)	4 (11,1)
Mercado 1	0	0	1 (16,7)	1 (8,3)	2 (5,5)
Mercado 2	4 (25,0)	0	0	2 (16,7)	6 (16,7)
Humana**	5 (31,3)	1 (50,0)	5 (83,3)	0	11 (30,6)
Total	16 (100,0)	2 (100,0)	6 (100,0)	12 (100,0)	36 (100,0)

* Cepas estudadas com exceção dos controles *L. monocytogenes* ATCC 19115 e ATCC 19111 e *L. innocua* ATCC 33090 e CLIP 12612 (N=36). ** Cepas isoladas de líquido cefalorraquidiano, placenta e sangue, no período de 1977 a 2004.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA E DA PRODUÇÃO DA FOSFOLIPASE A (PI-PLC)

Entre as 40 cepas estudadas, 80,0% apresentaram multiplicação com halo no cultivo em ALOA[®], caracterizando a produção e a atividade da PI-PLC. Destas, 82,5% apresentaram atividade hemolítica positiva, sendo esta classificada em hemólise positiva forte para as cepas ATCC 19115 e ATCC 19111 e as originárias de infecção humana, positiva para os isolados ambientais e alimentares de *L. monocytogenes* e positiva fraca para as cepas atípicas. Na Figura 5 e na Tabela 2 são apresentados os resultados destas provas fenotípicas.

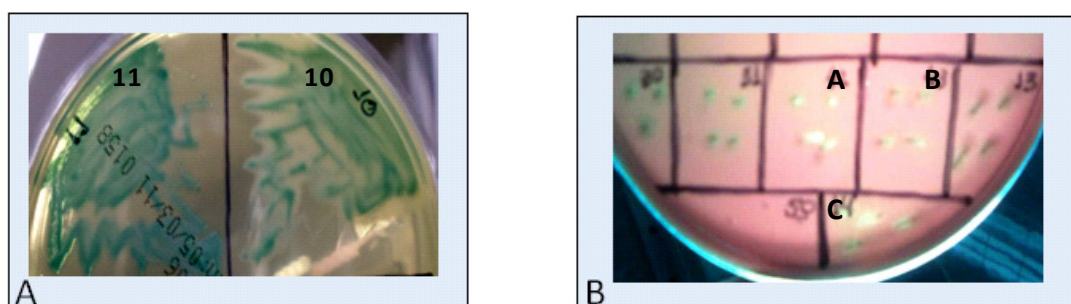


Figura 5 – Resultados das provas fenotípicas. A: Cultivo bacteriano em meio ALOA[®]; Cepa 11: *L. innocua* ATCC 33090, Cepa 10: *L. monocytogenes* ATCC 19115. B: Prova hemolítica com inoculação por picada; A, B, C: hemólise positiva.

Dentre os resultados obtidos, destacam-se sete cepas sorotipificadas como *L. innocua* sorotipo 6a; cinco destas (*Lin5 – 9*) apresentaram uma hemólise muito fraca, enquanto que as outras duas (*Lm4* e *Lm33*) também apresentaram resultado positivo fraco para hemólise, porém de maior intensidade que as anteriores. As cepas *Lm4* e *Lm33* apresentaram hemólise semelhante à de quatro cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2a, sendo que esses seis isolados (*Lm4*, *Lm33* e *Lm28 – 31*) foram obtidos na mesma coleta e no mesmo mercado a partir de cortes de carne distintos.

Tabela 2 - Descrição das cepas estudadas e resultados dos testes de hemólise e produção da Fosfolipase A em meio ALOA[®].

Cepa	Espécie	Sorotipo	Origem	Sítio	Ano	ALOA [®]	Hemólise
Lm1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm2	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm3	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Mercado 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm21	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm22	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm23	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm25	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm26	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm27	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	AB 1	Piso	2008	Halo	Positivo
Lm28	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lm29	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lm30	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lm31	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lm34	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Humana	Sangue	1989	Halo	Positivo Forte
Lm35	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Humana	Sangue	2004	Halo	Positivo Forte
Lm36	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Humana	Sangue	1977	Halo	Positivo Forte
Lm37	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Humana	LCR	1982	Halo	Positivo Forte
Lm38	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	Humana	LCR	1983	Halo	Positivo Forte
Lm39	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Humana	Placenta	1978	Halo	Positivo Forte
Lm39a	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Humana	Placenta	1978	Sem halo	Positivo Fraco
Lm40	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Humana	Sangue	1985	Halo	Positivo Forte
Lm41	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Humana	LCR	1997	Halo	Positivo Forte
Lm42	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Humana	LCR	1997	Halo	Positivo
Lm43	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Humana	LCR	1983	Halo	Positivo
Lin5	<i>L. innocua</i>	6a	Mercado 1	Piso	2008	Halo ¹	Positivo Fraco ²
Lin6	<i>L. innocua</i>	6a	AB 2	Piso	2008	Halo ¹	Positivo Fraco ²
Lin7	<i>L. innocua</i>	6a	AB 2	Piso	2008	Halo ¹	Positivo Fraco ²
Lin8	<i>L. innocua</i>	6a	AB 2	Piso	2008	Halo ¹	Positivo Fraco ²
Lin9	<i>L. innocua</i>	6a	AB 2	Piso	2008	Halo ¹	Positivo Fraco ²
Lm4	<i>L. innocua</i>	6a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lm33	<i>L. innocua</i>	6a	Mercado 2	Carne	2008	Halo	Positivo Fraco
Lin16	<i>L. innocua</i>	6a	AB 1	Piso	2006	Sem halo	Negativo
Lin17	<i>L. innocua</i>	6a	AB 1	Piso	2006	Sem halo	Negativo
Lin18	<i>L. innocua</i>	6a	AB 1	Piso	2006	Sem halo	Negativo
Lin19	<i>L. innocua</i>	6a	AB 1	Piso	2006	Sem halo	Negativo
Lin20	<i>L. innocua</i>	6a	AB 1	Piso	2006	Sem halo	Negativo
Lm10	<i>L. monocytogenes</i>	4b	ATCC 19115	-	-	Halo	Positivo Forte
Lm15	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	ATCC 19111	-	-	Halo	Positivo Forte
Lin11	<i>L. innocua</i>	6a	ATCC 33090	-	-	Sem halo	Negativo
Lin46	<i>L. innocua</i>	6a	CLIP 12612	-	-	Sem halo	Negativo

¹Halo sutil. ²Hemólise positiva muito fraca. AB 1 - Abatedouro 1; AB 2 - Abatedouro 2.

As cinco cepas (*Lin5 – 9*) de *L. innocua* também apresentaram resultado atípico no cultivo em ALOA[®], com aparecimento de halo sutil ao redor das colônias. Já nos isolados *Lm4* e *Lm33*, detectou-se halo semelhante às colônias de *L. monocytogenes*. A partir da multiplicação da cepa clínica *Lm39*, foi isolada uma colônia que não apresentou halo no cultivo em ALOA[®], além de produzir hemólise fraca. Esta foi nomeada como *Lm39a* e estudada como um novo isolado separadamente da *Lm39* original.

5.3 PESQUISA E MAPEAMENTO DOS GENES DE VIRULÊNCIA

5.3.1 Detecção e amplificação completa dos genes de virulência

Inicialmente, foram testados os iniciadores propostos no estudo, utilizando as reações e os programas seguindo as recomendações dos respectivos autores (JOHNSON et al., 2004; ROCHE et al., 2005; LIU et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008). Destes, apenas três pares funcionaram adequadamente, sendo estes específicos para os genes *prfA*, *inlC* e *inlJ*. O primeiro par de iniciadores, correspondente ao gene *prfA* e descrito por JOHNSON et al. (2004), proporcionou a amplificação parcial deste gene (87,8%), tendo como produto final uma sequência de 1206 pb. Os iniciadores relativos à detecção dos genes *inlC* e *inlJ* (LIU et al., 2007) originaram sequências de 517 pb e 238 pb, respectivamente. A partir destes iniciadores, foram detectadas 57,5% das cepas positivas para o gene *inlC*, 70,0% para *inlJ* e 67,4% para o gene *prfA*. Na Tabela 3 encontra-se uma síntese dos resultados obtidos.

Como não foram obtidos os resultados esperados para os iniciadores propostos para a detecção e amplificação completa dos genes *inlA* e *inlB* (TÉMOIN et al., 2008), decidiu-se por testar os iniciadores descritos por JUNG et al. (2003) para detecção inicial do *operon inlAB*. Apesar de JUNG et al. (2003) indicarem seu uso para detecção do *operon*, estes iniciadores apenas possibilitam a amplificação de um fragmento do gene *inlA*, originando um produto de 902 pb. Foram detectadas 70,0% das cepas positivas para o “*operon inlAB*” e 17,5% apresentaram bandas fracas. Na Tabela 3 são apresentados os resultados obtidos com estes iniciadores.

Tabela 3 - Distribuição da detecção inicial dos genes *prfA*, *inlC*, *inlJ* e *inlAB* em cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

	<i>Gene</i>			
	<i>inlJ</i>	<i>inlC</i>	<i>prfA</i>	<i>inlAB</i>
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Positivo	28 (70,0)	28 (70,0)	28 (67,4)	33 (82,5)
Negativo	12 (30,0)	12 (30,0)	12 (10,9)	7 (17,5)

Também não foram obtidos os resultados esperados para os iniciadores propostos para a amplificação completa dos genes *hly*, *plcA* e *plcB*, descritos por JOHNSON et al. (2004) e ROCHE et al. (2005). Estes iniciadores, embora apresentassem pareamento com o genoma das cepas padrão *L. monocytogenes* EGD-e e F2365 (sequências retiradas do GenBank), não proporcionaram o resultado esperado com as cepas estudadas.

Dessa forma, foram desenhados iniciadores específicos para amplificação completa dos genes *inlA*, *inlB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *inlC* e *inlJ*, incluindo iniciadores internos a estes para possibilitar seu sequenciamento, e até mesmo iniciadores para detectar mutações já descritas na literatura (Anexo 1). No Quadro 2 são apresentados os principais iniciadores desenvolvidos no presente estudo para os genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hly*, *prfA*, *plcA* e *plcB*.

A partir dos novos iniciadores foi possível detectar e amplificar por completo os genes *inlB*, *inlC*, *plcA*, *plcB* e *prfA*. Em anexo é apresentado um quadro com os resultados encontrados para os iniciadores propostos nas cepas estudadas (Anexo 2). Em relação ao gene *inlA*, foi possível detectá-lo e apenas amplificar um fragmento de 1200 pb, a partir do iniciadores *inlA In₁-Fw* e *inlA Detec-Rv*. Os iniciadores externos a este gene resultaram na amplificação de dois fragmentos, um de 2884 pb correspondente ao gene em questão, e outro fragmento de, aproximadamente, 750 pb cuja sequência não está relacionada ao *inlA*.

Os iniciadores externos do gene *inlB* apresentaram situação semelhante: as cepas controle de *L. monocytogenes* apresentaram um fragmento de 2146 pb referente ao *inlB*; as cepas clínicas apresentam um fragmento de, aproximadamente, 700 pb que corresponde a uma parte da sequência do *inlB*, enquanto que as cepas ambientais de *L. monocytogenes* com hemólise fraca exibem bandas fracas de 400 e 1300 pb cujas sequências não estão relacionadas ao *inlB*. No entanto, foi possível amplificar por completo este gene a partir dos iniciadores *inlB In-Fw*, *inlB Seq₃-Rv*, *inlB Seq₂-Fw* e *inlB Fim₃-Rv*.

Quadro 2 - Iniciadores desenhados para a pesquisa dos genes de virulência estudados.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Alvo
<i>inlA ext Fw</i>	CGGCTCCGTAGACAGATTAG	
<i>inlA ext Rv</i>	GTGATAGTCTCCGCTTGTAC	
<i>inlA In₁-Fw</i>	GTGAGAAGAAAACGA	<i>inlA</i>
<i>inlA Detec-Fw</i>	AAGTGATATAACTCC	
<i>inlA Detec-Rv</i>	TGGTGTAAGATCGCT	
<i>inlB ext Fw</i>	GCTAGATGTGGTTTTTCGGACT	
<i>inlB ext Rv</i>	TAAGCAGCGCAAAGGTGATTCTAC	
<i>inlB In-Fw</i>	GTGAAAGAAAAGCAC	<i>inlB</i>
<i>inlB Seq₃-Rv</i>	ATCCCGCGAATATA	
<i>inlB Seq₂-Fw</i>	TGATGGAACGGTAAT	
<i>inlB Fim₃-Rv</i>	TNATTTCTGTGCCCT	
<i>plcB ext Fw</i>	CCATACGACGTTAATTCTTGCAATG	<i>plcB</i>
<i>plcB ext Rv</i>	TATCCACCCGCTAACGAGTG	
<i>plcA ext Fw</i>	GAGGTTGCTCGGAGATATAC	
<i>plcA ext Rv</i>	CTGCTGTCCCTTTATCGTCG	<i>plcA</i>
<i>plcA Detec-Fw</i>	AACCATTATTATGCG	
<i>plcA Detec-Rv</i>	TGCAGCATACTGACG	
<i>hly ext Fw</i>	CGATAAAGGGACAGCAGGACT	
<i>hly ext Rv</i>	AGCCTGTTTCTACATTCTTCACAA	
<i>hly Detec-Fw</i>	TAACAACGCAGTAAA	<i>hly</i>
<i>hly Detec-Rv</i>	CGTAAGTCTCCGAGG	
<i>hly Fim-Fw</i>	CCTCCTGCATATATC	
<i>hly Fim-Rv</i>	TTATTCGATTGGATT	
<i>inlC In₁-Fw</i>	ATGCTAGTNTTAATTGTA	<i>inlC</i>
<i>inlC Fim₂-Rv</i>	CTAATTCTTGATAGGTTGTG	
<i>prfA Detec-Fw</i>	CTGCTAACAGCTGAGCTATG	
<i>prfA Detec-Rv</i>	GCTACCGCATACGTTATC	<i>prfA</i>
<i>prfA Fim Rv</i>	ATGAACGCTCAAGCA	

In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento.

Os resultados obtidos com os iniciadores desenvolvidos neste estudo são apresentados na Tabela 4. Pode-se observar que para todos os iniciadores, com exceção dos externos aos genes *inlB* e *inlJ*, duas cepas atípicas de *L. innocua* apresentaram resultados positivos (*Lm4* e *Lm33*). As cinco cepas atípicas remanescentes foram positivas para o gene *inlC* e positivas fracas para o *plcA* e fragmentos do *hly*. Estas também apresentaram resultado positivo fraco para os iniciadores propostos por JUNG et al. (2003) (*inlAB_Jung*). As cepas ambientais de *L. monocytogenes* com atividade hemolítica fraca (*Lm28 – 31*) apresentaram resultado positivo para todos os genes pesquisados. Todos estes resultados foram confirmados por sequenciamento.

Em relação ao gene *inlJ*, apenas foi possível sua detecção a partir dos iniciadores publicados por LIU et al. (2007). Apesar dos iniciadores desenhados, neste estudo, para amplificação completa deste gene (Quadro 3), esta não foi alcançada. Os melhores resultados obtidos foram 21 cepas positivas para os iniciadores externos ao *inlJ*; no entanto, não foi possível sequenciar por completo este fragmento gênico de 2727 pb, mesmo com os iniciadores internos desenvolvidos para este propósito.

Quadro 3 - Iniciadores desenhados para a pesquisa do gene de virulência *inlJ*.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Alvo
<i>inlJ ext Fw</i>	CACAATCAAGTCACATATCTCC	<i>inlJ</i>
<i>inlJ ext Rv</i>	CTATCCAAGTGGAAGAAGATTGAA	
<i>inlJ In-Fw</i>	TTGAAAACACTACTAAA	
<i>inlJ Fim-Rv</i>	CTATTTTTTCTTTTTCCAGA	
<i>inlJ Seq₃-Fw</i>	ACAACCTTAGACTGTAGC	
<i>inlJ Seq₃-Rv</i>	ACGTATAGCCTTCGATAGTT	

In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento.

Tabela 4 - Distribuição dos resultados para cada par de iniciadores segundo espécie.

Iniciadores	Espécie	Positivo	Negativo	Banda Inespecífica*
		N (%)	N (%)	N (%)
<i>inlC_Liu</i> ¹	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlC In – Fim</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>prfA Johnson – Fim</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>prfA_Johnson</i> ²	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>prfA Detec</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>plcA ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>plcA Detec</i>	<i>L. monocytogenes</i>	25 (96,2)	0	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>plcB ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlB ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	18 (69,2)	0	8 (30,8)
	<i>L. Innocua</i>	0	12 (85,7)	2 (14,3)
<i>inlB In – Seq</i> ₃	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlB Seq</i> ₂ – Fim	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlA ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	18 (69,2)	0	8 (30,8)
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	0
<i>inlA In – Detec</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlAB_Jung</i> ³	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>hly ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	25 (96,2)	1 (3,8)	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>hly Fim</i>	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>hly_Border</i> ⁴	<i>L. monocytogenes</i>	25 (96,2)	1 (3,8)	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>hly Detec</i>	<i>L. monocytogenes</i>	25 (96,2)	1 (3,8)	-
	<i>L. innocua</i>	7 (50,0)	7 (50,0)	-
<i>inlJ_Liu</i> ¹	<i>L. monocytogenes</i>	26 (100,0)	0	-
	<i>L. innocua</i>	2 (14,3)	12 (85,7)	-
<i>inlJ ext</i>	<i>L. monocytogenes</i>	21 (80,8)	5 (19,2)	-
	<i>L. innocua</i>	0	14 (100,0)	-

¹ Iniciadores publicados por LIU et al. (2007). ² Iniciadores publicados JOHNSON et al. (2004). ³ Iniciadores publicados por JUNG et al. (2003). ⁴ Iniciadores publicados por BORDER et al. (1990). * Banda inespecífica de tamanho menor que o esperado (vide Anexo 2). Células em destaque azul: iniciadores desenvolvidos no presente projeto.

5.3.2 Pesquisa de mutações nos genes de virulência

Foram encaminhados para sequenciamento os fragmentos gênicos amplificados das cepas ambientais de *L. monocytogenes* com hemólise fraca (*Lm28 – 31*) e *L. innocua* atípicas (*Lm4*, *Lin5 - 9*, *Lm33*), além das cepas controle de *L. monocytogenes* (*Lm10* e *Lm15*) e duas cepas clínicas para comparação (*Lm34* e *Lm38*). Foram identificadas substituições nucleotídicas nos genes *plcA*, *plcB*, *inlB*, *inlA*, *inlC* e *hly*, enquanto que no gene *prfA* foi detectada uma deleção de cinco nucleotídeos em todas as cepas de *L. monocytogenes* com atividade hemolítica fraca. Determinadas substituições proporcionaram mutações nas sequências de aminoácidos das proteínas PI-PLC, PC-PLC, InlB, InlC (Figuras 6 e 7), InlA e Hly (Figura 8).

Na sequência correspondente ao gene *inlC*, foi identificado um total de sete substituições nucleotídicas nas cepas *Lm28 – 31*, *Lm4* e *Lm33*. Destas substituições, apenas três resultaram em mutações nas sequências proteicas: nas cepas *Lm4* e *Lm33* a transição de Adenina para Citosina na primeira posição do códon 10 e a inversão de Tiamina para Adenina na segunda posição deste códon proporcionaram a mutação Ile10His, enquanto que nas cepas *Lm28 - 31* a transição de Tiamina para Citosina na segunda posição do códon 12 resultou na mutação Met12Thr (Figuras 6 e 7). Nas cepas *Lin5 – 9* não foram detectadas substituições nucleotídicas.

No gene *plcA*, foram detectadas dez substituições nucleotídicas nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33*. Destas substituições, a transição de Adenina para Guanina na primeira posição do códon 17 determinou a mutação Ile17Val, e a inversão de Tiamina para Adenina na segunda posição do códon 119 resultou na mutação Phe119Tyr na PI-PLC (Figuras 6 e 7). Também não foram identificadas alterações

nas sequências das cepas *Lin5* – 9. Na sequência do *plcB*, apenas duas transições de Tiamina para Citosina foram identificadas, na segunda e terceira posições do códon 13, que derivaram a mutação Ile13Thr nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33*.

No gene *inlB*, foram detectadas sete substituições nucleotídicas nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33*. No entanto, apenas as transições de Adenina para Guanina nos códons 117 e 132 resultaram nas mutações Ala117Thr e Val132Ile na InlB (Figuras 6 e 7). Na sequência referente ao gene *prfA*, foi identificada uma deleção de cinco nucleotídeos nas posições 706 a 709, que resultaram na ausência dos códons 236 e 237, nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33* (Figura 7).

Nos fragmentos amplificados para o gene *inlA* nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33*, foram identificadas oito substituições nucleotídicas, que resultaram em duas mutações: Thr51Ala e Ile157Leu (Figura 8). Nas cepas atípicas de *L. monocytogenes* e nos isolados *Lm4* e *Lm33*, foram observadas 15 substituições nucleotídicas nas sequências amplificadas do gene *hly*, enquanto que na sequência obtida para o isolado *Lin5* foram observadas 14 substituições e as cepas *Lin6* – 9 apresentaram 13 dessas substituições. No entanto, todas as proteínas apresentaram apenas duas mutações: Val438Ile e Lys523Ser (Figura 8).

5.4 IDENTIFICAÇÃO DOS DOMÍNIOS PROTEICOS

Foram identificados, nas sequências de aminoácidos da InlC, InlB, InlA, PI-PLC, PC-PLC e Hly, da cepa padrão *L. monocytogenes* EGD-e, os domínios proteicos específicos e comparou-se a localização desses domínios com a das mutações detectadas nas cepas estudadas.

	1	28/29/35	45	84	94	141	186/220/231	276/306/318	334 / 345	390/397/415	426	478	501/510	629	702/711/716	735/750/760	833/843/844/852		
<i>inlC</i> EGDe	*	AT..T..A...	T..G...	G....G....	A..C..G.....	T..G..G..G..C....	C...T..A..C..T..T..A...	A...C..T..G...C..A..G....	C..CA...*										
<i>inlC</i> SLCC2378	*	C..G.....	A...A...	G..A..C..C...	A...T..T..G..C...	C...T...G.....	A..A..T..T..A...T..TC...												
<i>inlC</i> SLCC2540	*	C..G.....	A...A...	G..A..C..C...	A...T..T..G..C...	C...T...G.....	A..A..T..T..A...T..TC...												
<i>inlC</i> 08-5578	*		C.....				T...C.....												
<i>inlC</i> 08-5923	*		C.....				T...C.....												
<i>inlC</i> SLCC7179	*						T...C.....												
<i>inlC</i> Lm28	*	C..G.....					T...C.....						T.....						
<i>inlC</i> Lm29	*	C..G.....					T...C.....						T.....						
<i>inlC</i> Lm30	*	C..G.....					T...C.....						T.....						
<i>inlC</i> Lm31	*	C..G.....					T...C.....						T.....						
<i>inlC</i> Lm4	*	CA.....					T...C.....						T.....						
<i>inlC</i> Lm33	*	CA.....					T...C.....						T.....						
	1	11/18/20/37/39	49	56	81	111/114/117	162/189/213/216/250/274	356						690	784/795			954	
<i>plcA</i> EGDe	*	A..GA..TA...	A...A...	A...G..A..A.....	C..A..CT...C..T.....	T.....								T.....	A..A.....				
<i>plcA</i> 08-5578	*	T..AG..G.....	G...G.....											C.....	T.....				
<i>plcA</i> 08-5923	*	T..AG..G.....	G...G.....												T.....				
<i>plcA</i> CNL895807	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C..TC.....				A.....					G..T.....				
<i>plcA</i> CNL895795	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C..TC.....				A.....					G..T.....				
<i>plcA</i> A23	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C..TC.....				A.....					G..T.....				
<i>plcA</i> Lm28	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
<i>plcA</i> Lm29	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
<i>plcA</i> Lm30	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
<i>plcA</i> Lm31	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
<i>plcA</i> Lm4	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
<i>plcA</i> Lm33	*		G...G.....		A..T..T.....	T..C.....	A.....							C.....	T.....				
	1	15	38/39											787		870			
<i>plcB</i> EGDe	*	A.....	TT.....											G.....		*			
<i>plcB</i> 08-5578	*		CC.....											A.....		*			
<i>plcB</i> 08-5923	*		CC.....											A.....		*			
<i>plcB</i> SLCC5850	*		C.....	CC.....															
<i>plcB</i> Lm28	*			CC.....															
<i>plcB</i> Lm29	*			CC.....															
<i>plcB</i> Lm30	*			CC.....															
<i>plcB</i> Lm31	*			CC.....															
<i>plcB</i> Lm4	*			CC.....															
<i>plcB</i> Lm33	*			CC.....															
	1	120	145	324	349	394	399	421		762		1053		1532		1656	1665	1893	
<i>inlB</i> EGDe	*	C...T...G...G...	G...G...T.....							T.....				G.....		C...G.....		*	
<i>inlB</i> 08-5578	*	T..C..A..A...	A..A..C.....							C.....									
<i>inlB</i> 08-5923	*	T...C...A...A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> CNL895807	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....						T...A.....			
<i>inlB</i> CNL895795	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....						T...A.....			
<i>inlB</i> A23	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....						A.....		T...A.....	
<i>inlB</i> Lm28	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> Lm29	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> Lm30	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> Lm31	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> Lm4	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									
<i>inlB</i> Lm33	*	A...A...A..A...	A...A...C.....							C.....									

Figura 6 - Substituições nucleotídicas observadas nos genes *inlC*, *plcA*, *plcB* e *inlB*. Cepas *Lm28* - *31*, *Lm4* e *Lm33* (deste estudo) alinhadas com a cepa padrão *L. monocytogenes* EGDe e as mutantes descritas na literatura. Asteriscos indicam *start* e *stop* códons; pontos representam nucleotídeos iguais e os números indicam as posições das substituições.

InIC EGDe	1 10 12 32 74 102/112 133 210 239 254 278/282/283	*..I..M.....V.....Q.....K..V...L.....K...S...D...T..K..*
InIC SLCC2378		*...T.....I.....K.....V.....R...N..N...I..Q..*
InIC SLCC2540		*...T.....I.....K.....N..M...V.....R...N..N...I..Q..*
InIC 08-5578		*.....*
InIC 08-5923		*.....*
InIC SLCC7179		*.....*
InIC Lm28		*...T.....*
InIC Lm29		*...T.....*
InIC Lm30		*...T.....*
InIC Lm31		*...T.....*
InIC Lm4		*...H.....*
InIC Lm33		*...H.....*
PI-PLC EGDe	1 4 7 13 17/19 119 262 318	*..N..Q...L...I..Y.....F.....T.....*
PI-PLC 08-5578		*..I...R...V...C.....*
PI-PLC 08-5923		*..I...R...V...C.....*
PI-PLC CNL895807		*.....V.....Y.....A.....*
PI-PLC CNL895795		*.....V.....Y.....A.....*
PI-PLC A23		*.....V.....Y.....A.....*
PI-PLC Lm28		*.....V.....Y.....*
PI-PLC Lm29		*.....V.....Y.....*
PI-PLC Lm30		*.....V.....Y.....*
PI-PLC Lm31		*.....V.....Y.....*
PI-PLC Lm4		*.....V.....Y.....*
PI-PLC Lm33		*.....V.....Y.....*
PC-PLC EGDe	1 5 13 263 290	*..K...I.....E.....*
PC-PLC 08-5578		*...T.....K.....*
PC-PLC 08-5923		*...T.....K.....*
PC-PLC SLCC5850		*..N...T.....*
PC-PLC Lm28		*...T.....*
PC-PLC Lm29		*...T.....*
PC-PLC Lm30		*...T.....*
PC-PLC Lm31		*...T.....*
PC-PLC Lm4		*...T.....*
PC-PLC Lm33		*...T.....*
InIB EGDe	1 41 49 117 132 511 630	*...P..S.....A..V.....G.....*
InIB 08-5578		*...S..P...T...I.....*
InIB 08-5923		*...S..P...T...I.....*
InIB CNL895807		*.....T...I.....*
InIB CNL895795		*.....T...I.....*
InIB A23		*.....T...I.....D.....*
InIB Lm28		*.....T...I.....*
InIB Lm29		*.....T...I.....*
InIB Lm30		*.....T...I.....*
InIB Lm31		*.....T...I.....*
InIB Lm4		*.....T...I.....*
InIB Lm33		*.....T...I.....*
PrfA EGDe	1 236/237/238	*.....LN*
PrfA 08-5578		*.....*
PrfA 08-5923		*.....*
PrfA Lm28		*.....-X*
PrfA Lm29		*.....-X*
PrfA Lm30		*.....-X*
PrfA Lm31		*.....-X*
PrfA Lm4		*.....-X*
PrfA Lm33		*.....-X*

Figura 7 - Substituições de aminoácidos nas proteínas InIC, PI-PLC, PC-PLC, InIB e PrfA. Cepas *Lm28* - *31*, *Lm4* e *Lm33* (deste estudo) alinhadas com a cepa padrão *L. monocytogenes* EGDe e as mutantes descritas na literatura. Asteriscos indicam *start* e *stop* códons; pontos representam aminoácidos iguais e os números indicam as posições das substituições. PC-PLC – Fosfolipase B. PI-PLC - Fosfolipase A.

A

	1	8	63	84	150/151	213/237	280	336/342/352	424	465/469	516	560	621	660	906/946/972/985/987	1035	1143	2403											
<i>inlA</i> EGDe	*	A	C	T	TA	A	A	G	C	G	A	A	G	A	C	G	A	G	T	T	T	CG	T	C	-	*			
<i>inlA</i> 08-5578	*					T	T	G		A	T	A	A														*		
<i>inlA</i> 08-5923	*					T	T	G		A	T	A	A														*		
<i>inlA</i> ATCC19115	*	G	T			G	G	T	T	G	T												G	C	A	TA	G	-	*
<i>inlA</i> F2365	*	G	T			G	G	T	T	G	T												G	C	A	TA	G	-	*
<i>inlA</i> Lm28	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*
<i>inlA</i> Lm29	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*
<i>inlA</i> Lm30	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*
<i>inlA</i> Lm31	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*
<i>inlA</i> Lm4	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*
<i>inlA</i> Lm33	*					T	C	CG	G														C	T	G			-	*

	1	78	254	297	588	877	1101/1260/1263/1278/1299/1312/1381/1383/1422/1443/1501/1542/1568/1569/1590																													
<i>hly</i> EGDe	*	T	A	T	T	A	C	C	A	T	G	C	A	G	T	T	C	AA	-	*																
<i>hly</i> 08-5578	*						C														*															
<i>hly</i> 08-5923	*						C														*															
<i>hly</i> Lm28	*						C														*															
<i>hly</i> Lm29	*						C														*															
<i>hly</i> Lm30	*						C														*															
<i>hly</i> Lm31	*						C														*															
<i>hly</i> Lm4	*						C														*															
<i>hly</i> Lm33	*						C														*															
<i>hly</i> Lin5																																				
<i>hly</i> Lin6																																				
<i>hly</i> Lin7																																				
<i>hly</i> Lin8																																				
<i>hly</i> Lin9																																				

B

	1	3	51	94	118	142	157	187	381	416/420/426/454/474/476/500/530/558	594/648/664	738/781/790	801																							
<i>InlA</i> EGDe	*	K	T	V	N	T	I	S	N	AAA	T	S	P	V	H	N	A	S	A	D	L	M	-	*												
<i>InlA</i> 08-5578	*			L	D			N																		*										
<i>InlA</i> 08-5923	*			L	D			N																		*										
<i>InlA</i> ATCC19115	*	R		L	D	S			EPV	A	N	S	A	Y	D	P	T	T	N	I	V	-	*													
<i>InlA</i> F2365	*	R		L	D	S			EPV	A	N	S	A	Y	D	P	T	T	N	I	V	-	*													
<i>InlA</i> Lm28	*			A																																
<i>InlA</i> Lm29	*			A																																
<i>InlA</i> Lm30	*			A																																
<i>InlA</i> Lm31	*			A																																
<i>InlA</i> Lm4	*			A																																
<i>InlA</i> Lm33	*			A																																

	1	26	85	293	438	523	530	
<i>Hly</i> EGDe	*	D	N	I	V	K	-	*
<i>Hly</i> 08-5578	*							*
<i>Hly</i> 08-5923	*							*
<i>Hly</i> Lm28	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lm29	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lm30	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lm31	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lm4	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lm33	*					I	S	*
<i>Hly</i> Lin5						I	S	*
<i>Hly</i> Lin6						I	S	*
<i>Hly</i> Lin7						I	S	*
<i>Hly</i> Lin8						I	S	*
<i>Hly</i> Lin9						I	S	*

Figura 8 – Substituições nucleotídicas observadas nos genes *inlA* e *hly* (A) e mutações detectadas nas proteínas InlA e Hly (B). Cepas *Lm28* - *31*, *Lm4*, *Lm33* e *Lin5* - *9* (deste estudo) alinhadas com a cepa padrão *L. monocytogenes* EGDe e as mutantes descritas na literatura. Asteriscos indicam *start* e *stop* códons; pontos representam nucleotídeos / aminoácidos iguais e os números indicam as posições das substituições; “espaço vazio” representa região não amplificada.

No caso das internalinas, estas são caracterizadas por domínios de repetidos resíduos ricos em leucina (*leucine-rich repeats* - LRR). As mutações identificadas na InlC possuem localização distinta desses domínios, no entanto, as mutações Ala117Thr e Val132Ile se localizam nos domínios LRR da InlB. A mutação Ile157Leu, detectada no fragmento da InlA, também se encontra em um dos domínios LRR desta proteína.

Já, as sequências das fosfolipases são caracterizadas por domínios específicos. A PI-PLC possui o domínio fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC *X-box domain*) no qual a mutação Phe119Tyr foi identificada; a PC-PLC é caracterizada pelo domínio fosfolipase C zinco-dependente no qual não foi detectada mutação nas cepas estudadas. A Listeriolisina O (Hly) pertence à família das proteínas formadoras de poros colesterol dependentes que são caracterizadas por motivos *Thiol-activated cytolysins signature*. No entanto, as mutações identificadas nos fragmentos da Hly possuem localização distinta destes.

5.5 PREDIÇÃO DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DAS PROTEÍNAS

A predição da estrutura secundária das proteínas InlC, InlB, InlA, PI-PLC, PC-PLC e Hly foi realizada utilizando as sequências de aminoácidos das cepas atípicas estudadas e das cepas previamente descritas na literatura. As estruturas resultantes foram comparadas visualmente em busca de alterações decorrentes das mutações detectadas. No Anexo 4 encontra-se a representação gráfica das estruturas analisadas.

No caso da InlC, foram observadas alterações na estrutura das sequências das cepas *Lm28 – 31*, *Lm4* e *Lm33* que são distintas das cepas atípicas descritas na

literatura. Nas cepas *Lm28 – 31* foram detectados o aparecimento de uma α -hélice na posição 38-45 e a ausência das folhas- β nas posições 233-234 e 239-240. Já as cepas *Lm4* e *Lm33* foram caracterizadas pela substituição da folha- β por uma α -hélice na posição 17-22 e a pela ausência das folhas- β nas posições 203-204, 233-234 e 239-240. A estrutura secundária obtida para as cepas *Lin5 – 9* foi idêntica a da cepa padrão *L. monocytogenes* EGD-e.

No caso da PI-PLC, foi detectada uma folha- β na posição 28-29 nas cepas *Lm28 – 31*, *Lm4* e *Lm33*, além da ausência de uma folha- β na posição 122-123 que também foi observada em algumas cepas atípicas já publicadas. Já na PC-PLC, foi identificado o aparecimento da α -hélice na posição 30-33 e a alteração da α -hélice da posição 208-215, nas cepas *Lm28 – 31*, *Lm4* e *Lm33*, sendo que essas alterações são distintas das demais cepas descritas na literatura.

A predição da InlB apresentou mais de cinco alterações em folhas- β na estrutura secundária das cepas *Lm28 – 31*, *Lm4* e *Lm33*. Na predição realizada para o fragmento da InlA destas mesmas cepas, foi observada apenas a ausência da α -hélice da posição 33-37. Já no caso da Hly, não foram observadas alterações nas estruturas das cepas estudadas quando comparadas com as demais cepas.

5.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DE *Listeria*

Para a confirmação da identificação das espécies do gênero *Listeria* foi proposta a amplificação parcial e sequenciamento do gene *prs*. O dendrograma obtido é formado por três grupos: um composto pela *L. rocourtiaae*, outro pela *L. graveyi* e um terceiro grupo composto por chaves das espécies *L. monocytogenes* e *L.*

innocua, *L. marthii*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri*. Neste grupo, a primeira chave apresenta num mesmo ramo (azul) as cepas padrão de *L. monocytogenes* e *L. innocua* e os isolados *Lin5 – 9*, com 100% de similaridade genética. Nesta mesma chave, destaca-se um segundo ramo (vermelho) composto exclusivamente pelas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33* (Figura 9).

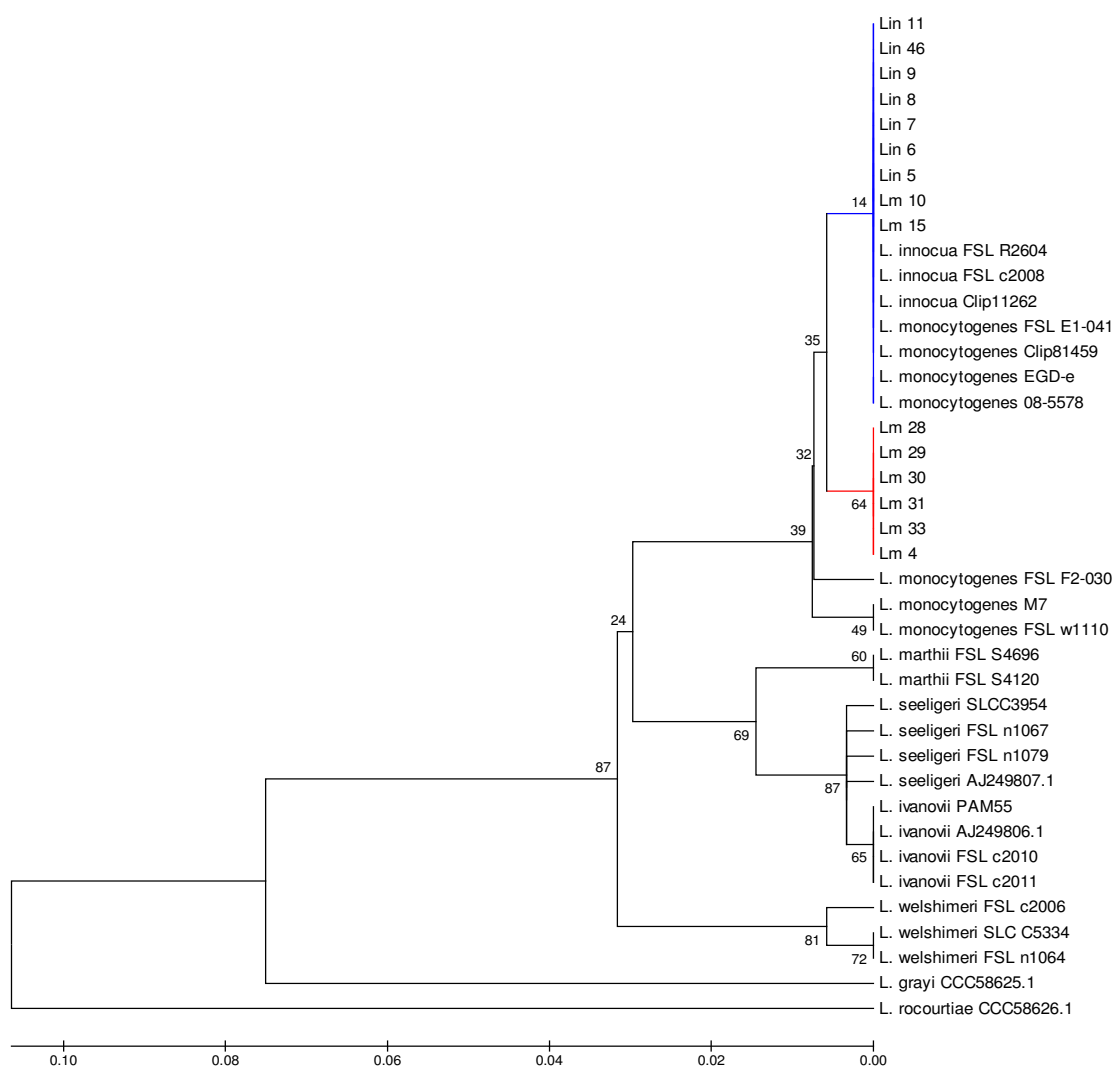


Figura 9 - Dendrograma demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *Listeria* com base nas sequências nucleotídicas do gene *prs*. Este foi construído pelo método de *Minimum Evolution* (modelo *Tamura-3-parameter*) no programa MEGA 5.10. Os valores de *bootstrap* apresentados nos ramos correspondentes foram avaliados a partir de 500 réplicas.

Pelo fato deste fragmento gênico não possibilitar a diferenciação completa das cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, decidiu-se por realizar a amplificação completa e sequenciamento do gene 16S rRNA para distinção destas espécies. O dendrograma resultante possibilitou a distinção das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, sendo este formado por três grandes grupos: um composto por *L. gravyi* e *L. murray*, outro pela *L. rocourtiae* e o terceiro grupo é composto por cepas das espécies *L. monocytogenes* e *L. marthii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* (Figura 10). Pode-se observar que os isolados *Lin5 – 9* e *Lin11* foram agrupados com as cepas padrão de *L. innocua* (ramo azul), enquanto que os isolados *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33* (ramo vermelho) foram agrupados com cepas padrão de *L. monocytogenes*.

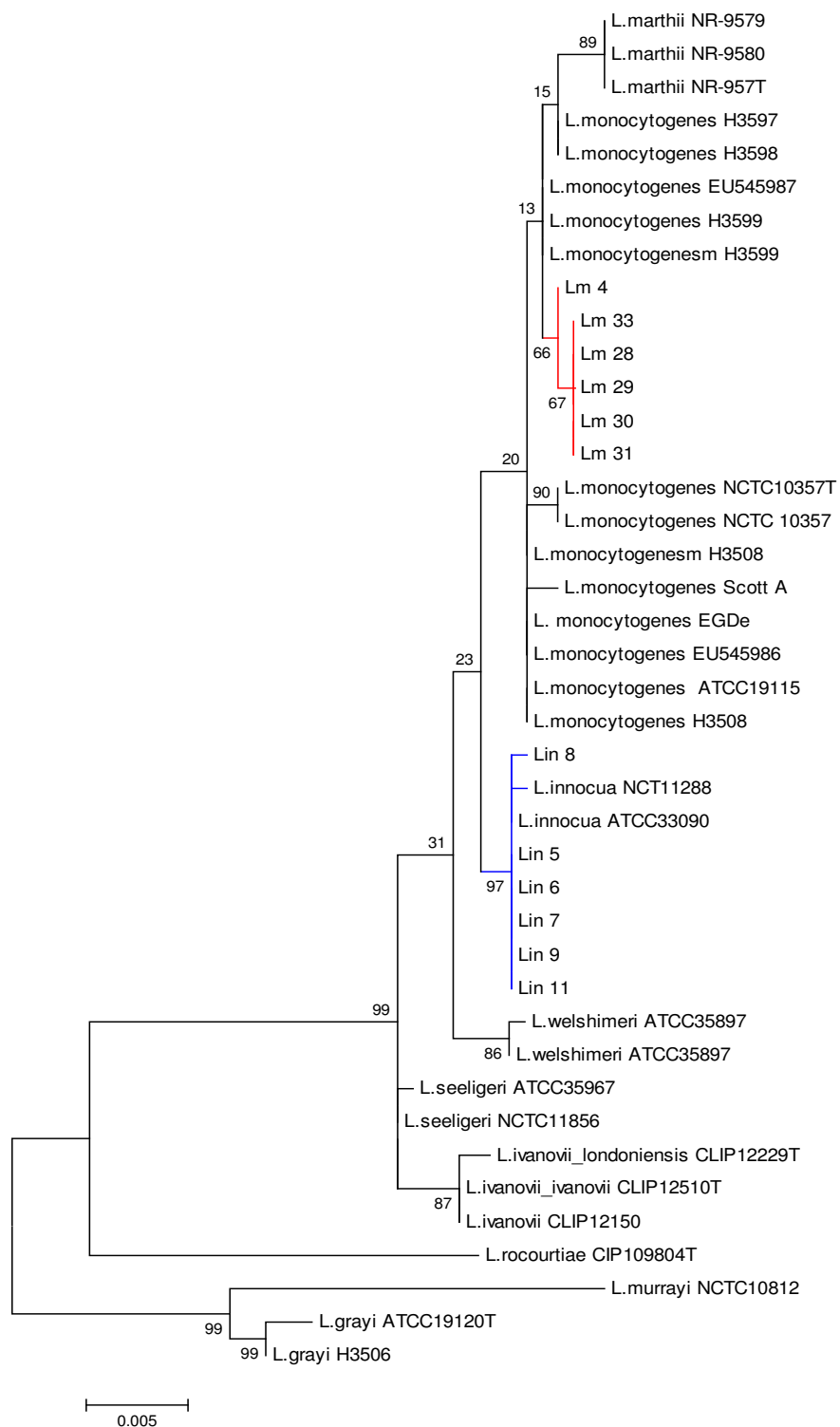


Figura 10 - Dendrograma demonstrando as relações evolutivas entre as cepas de *Listeria* com base nas seqüências nucleotídicas do gene 16S rRNA. Este foi construído pelo método de *Maximum-likelihood* (modelo *Tamura-3-parameter*) no programa MEGA 5.10. Os valores de *bootstrap* apresentados nos ramos correspondentes foram avaliados a partir de 500 réplicas.

6. DISCUSSÃO

A pesquisa dos mecanismos de virulência das bactérias do gênero *Listeria* adquiriu importância nas últimas décadas, quando o micro-organismo passou a ser utilizado como modelo de estudo de infecção intracelular. Desde então, os fatores de virulência de suas espécies estão sendo descritos e seus mecanismos de ação e respectivos genes codificadores são estudados por distintas técnicas moleculares e de experimentação *in vivo* e *in vitro*.

Além da utilização de *Listeria* como modelo de estudo, o aumento da incidência de listeriose nos Estados Unidos da América (EUA) e na União Européia demandam atenção da comunidade científica (ANGULO, 2009; ALLERBERGER e WAGNER, 2010). De 2008 a 2009 houve aumento de 19% na incidência de listeriose na União Européia com uma taxa de fatalidade de 17% (EFSA, 2011). Além dos casos de infecção por *L. monocytogenes*, os relatos de listeriose ocasionada por outras espécies do gênero, como *L. innocua* (PERRIN et al., 2003), *L. ivanovii* (GUILLET et al., 2010) e *L. seeligeri* (ROCOURT et al., 1986), também demandam atenção para a pesquisa da origem da patogenicidade dessas espécies para o homem.

O presente estudo teve o objetivo de detectar os genes *hly*, *plcA*, *plcB*, *prfA*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* em cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*. Estes genes são característicos de *L. monocytogenes* e essenciais para infecção intracelular; no entanto, algumas variações já foram descritas nas espécies *L. innocua*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*. A detecção dos genes *hly*, *plcA*, *prfA*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* nas cepas do presente estudo pode representar um avanço no estudo de isolados ambientais de *Listeria* no Brasil. A presença destes genes, nos isolados de ambiente e carne, sugere um potencial patogênico e possível risco à saúde humana. Como a detecção gênica

não assegura a expressão dos fatores de virulência é necessária, pelo menos, a confirmação por amplificação completa e sequenciamento desses genes na busca de possíveis mutações que determinem alterações na expressão ou na função de suas proteínas.

Os resultados obtidos apresentam a detecção de todos os genes estudados e a amplificação completa e sequenciamento da maioria destes. Como os genes pesquisados são característicos de *L. monocytogenes*, todos estes foram detectados nas cepas clínicas e ambientais desta espécie, com exceção do isolado *Lm39a*. As cepas de *L. monocytogenes* com atividade hemolítica fraca (*Lm28 – 31*) também apresentaram resultado positivo para os genes estudados. Já as cepas de *L. innocua* atípicas, *Lin5 – 9*, apresentaram bandas fracas para os genes *inlC*, *plcA*, *hly* e para o operon *inlAB*, enquanto que as cepas *Lm4* e *Lm33* apresentaram resultado positivo para todos os genes estudados.

As provas fenotípicas de hemólise e do cultivo em ALOA[®] fornecem indícios da expressão dos genes *hly* e *plcA* que é controlada e ativada pelo Fator Regulador Positivo (PrfA) codificado pelo gene *prfA*, que também é responsável pela ativação dos genes *plcB*, *inlA*, *inlB*, entre outros. Dessa forma, o fenótipo de hemólise positiva e produção de halo no meio ALOA[®], decorrente da ação da PI-PLC, sugere a expressão dos genes *hly*, *plcA* e *prfA*, além dos demais genes detectados, cuja expressão é controlada pelo PrfA.

No caso das cepas de *L. monocytogenes* com fenótipo atípico, a literatura direciona para a busca por mutações nos genes de virulência que resultem em alteração da sua expressão ou da função de suas respectivas proteínas. Já foram descritas mutações que promovem a ativação constitutiva do *prfA*, resultando em cepas de *L. monocytogenes* com acentuada virulência (MINER et al., 2008; FREITAG et al., 2009), assim como

mutações pontuais nos genes de virulência que impedem sua expressão ou alteram a composição de suas proteínas ocasionando a redução da patogenicidade (ROCHE et al., 2005; TÉMOIN et al., 2008; ROCHE et al., 2009).

No presente estudo foram identificadas 11 cepas com fenótipo atípico: quatro isolados de *L. monocytogenes* com hemólise fraca e sete cepas de *L. innocua* com hemólise fraca e halo no meio ALOA[®], sendo que duas destas apresentavam hemólise mais acentuada que as demais, semelhante ao fenótipo das cepas de *L. monocytogenes* citadas acima. Nas cepas atípicas de *L. monocytogenes* foram amplificados todos os genes estudados e foram identificadas substituições nucleotídicas em seis destes genes que alteram a composição de suas proteínas e que podem explicar o fenótipo dessas cepas.

As mutações detectadas nos genes *inlB* e *plcA*, nas cepas *Lm28 - Lm31*, *Lm4* e *Lm33*, corroboram as descritas na literatura. As mutações Ala117Thr e Val132Ile, detectadas, no presente estudo, no gene *inlB*, já foram descritas por TÉMOIN et al. (2008) e ROCHE et al. (2009). Estas mutações estão localizadas em domínios LRR da InlB, que estão relacionados à interação desta proteína com o receptor celular Met. Dessa forma, as mutações podem interferir na ação de adesina da InlB e comprometer a internalização de *L. monocytogenes* em células não-epiteliais. No entanto, ROCHE et al. (2009) indicam que apenas a mutação Ala117Thr muda a natureza hidrofóbica do aminoácido e estaria relacionada com a inativação da proteína.

No gene *plcA* já foram descritas 12 substituições nucleotídicas que resultaram em três mutações na enzima PI-PLC: Ile17Val, Phe119Tyr e Thr262Ala (ROCHE et al., 2005). Destas, apenas as duas primeiras foram detectadas no presente estudo, sendo que a mutação Phe119Tyr está localizada no domínio PI-PLC, enquanto que a Ile17Val está localizada na sequência sinal da proteína (TÉMOIN et al., 2008). No entanto, são as

mutações Phe119Tyr e Thr262Ala que ocasionam alteração das propriedades físico-químicas dos aminoácidos e somente a Thr262Ala foi considerada como responsável pela ausência de atividade da PI-PLC (TÉMOIN et al., 2008).

A mutação identificada no gene *plcB*, neste estudo, é distinta das descritas na literatura. ROCHE et al. (2005) descreveram seis substituições nucleotídicas que resultaram em quatro mutações na proteína numa cepa com baixa atividade da enzima PC-PLC, enquanto que em outras duas cepas caracterizadas pela ausência da atividade da PC-PLC não foram detectadas alterações nas sequências proteicas. A mutação Ile13Thr, apresentada no presente trabalho, não se localiza no domínio fosfolipase C zinco-dependente da enzima, porém foram detectadas alterações na estrutura secundária da proteína das cepas mutantes que podem ser decorrentes desta mutação.

Em relação ao gene *inlC*, não foram encontrados na literatura relatos sobre mutações neste gene que ocasionassem alteração da virulência de cepas de *L. monocytogenes*. Neste estudo, foram identificadas as mutações Ile10His nas cepas *Lm4* e *Lm33* e a Met12Thr nas cepas *Lm28 - Lm31*; no entanto, nenhuma destas se localiza nos domínios LRR da proteína. Porém, foram detectadas alterações na estrutura secundária da InlC nas cepas mutantes que podem ser decorrentes destas mutações e que, possivelmente, alterem sua função.

Poucos estudos sobre mutações no gene *hly* foram realizados na última década. GLOMSKI et al. (2003) relataram a construção de isolados de *L. monocytogenes* com gene *hly* mutante e que apresentavam baixa virulência em ensaios *in vivo*. As mutações detectadas no gene *hly*, no presente estudo, são distintas das apresentadas por GLOMSKI et al. (2003), porém não foram observadas alterações na estrutura secundária da Hly nas cepas *Lm28 - Lm31*. Dessa forma, pode-se propor que a redução da atividade hemolítica nessas cepas seja decorrente da deleção observada no gene *prfA*,

já que este é o ativador do *cluster* LIPI-1, no qual o gene *hly* se encontra. No entanto, o comprometimento do *prfA* originaria a redução da expressão de todos os genes da LIPI-1, mesmo que estes tenham ativação secundária por outro gene como, por exemplo, o *sigB* (σ^B). Para confirmar esta hipótese seria necessário avaliar a expressão desses outros genes seja por técnicas de transcriptômica ou por ensaio enzimático.

Nos fragmentos obtidos para o gene *inlA*, foram identificadas duas mutações nas cepas *Lm28 - 31*, *Lm4* e *Lm33*. Estas são distintas das descritas na literatura que ocasionam a produção de uma internalina truncada que não é expressa (TÉMOIN et al., 2008; ROCHE et al., 2009). No entanto, as cepas mutantes, do presente estudo, apresentaram alteração da estrutura secundária da InlA. Para a confirmação da alteração da função desta proteína, assim como da InlB, seria necessário a complementação do estudo com a detecção dessas proteínas ou um ensaio *in vitro* com células com receptores E-caderina, que são específicos para estas internalinas.

No caso do gene *inlJ*, apenas foi possível sua detecção a partir dos iniciadores publicados por LIU et al. (2007). Apesar do desenvolvimento de novos iniciadores, neste estudo, sua amplificação completa e sequenciamento não foram alcançados com eficiência e reprodutibilidade. Este gene foi proposto por LIU et al. (2003; 2007) como marcador de virulência em cepas *L. monocytogenes*; no entanto, a dificuldade de sua amplificação e as poucas publicações sobre este gene originam dúvidas sobre o uso do *inlJ* para identificação e inferência do potencial patogênico de isolados de *Listeria*.

A utilização da predição da estrutura secundária das proteínas e a suposição de que estas alterações identificadas sejam indícios de alteração na função proteica também é um tema que origina incertezas, afinal, é uma predição realizada a partir de modelos estatísticos. A predição da estrutura terciária por homologia também não fornece mais informações sobre a produção e a função da proteína em questão. A comprovação da

produção só é obtida a partir de técnicas de proteômica que detectam e caracterizam a proteína desejada, enquanto que a função pode ser comprovada por ensaios enzimáticos bioquímicos ou por ensaios *in vivo*. No entanto, a predição da estrutura de proteínas ainda é um método que exige menos tempo e equipamentos e que fornece informações que instigam a continuidade e aprofundamento do estudo das proteínas.

Em relação às cepas atípicas *Lm4*, *Lin5 – 9* e *Lm33*, estas foram inicialmente identificadas como *L. innocua* sorotipo 6a, por sorotipificação; no entanto, estas apresentaram fenótipo de hemólise fraca e formação de halo em cultivo em ALOA[®] que não é sugestivo de *L. innocua*, mas sim, de *L. monocytogenes*. Também foi detectada a presença dos genes *plcA*, *inlC* e fragmentos do *hly* nas cepas *Lin5 – 9*, enquanto que as cepas *Lm4* e *Lm33* possuem todos os genes pesquisados.

A amplificação completa do gene *hly* não foi alcançada nas cepas *Lin5 – 9*. A presença de sequências de inserção entre os fragmentos gênicos detectados pode ser uma explicação, assim como a possível deleção das regiões não amplificadas. No entanto, o fenótipo dessas cepas indica a existência de atividade hemolítica fraca que requer ação desta enzima. Supõe-se, assim, que apesar da dificuldade de amplificação dessas regiões, não existam grandes alterações da expressão e função desta proteína.

JOHNSON et al. (2004) e VOLOKHOV et al. (2007) já descreveram a presença dos genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* em cepas de *L. innocua* com hemólise atípica; algumas dessas cepas também foram caracterizadas com sequências parálogas ao *inlC*, mutações no gene *inlA* e ausência do *inlB*. Dessa forma, essas cepas apresentavam resultado positivo para hemólise, formação de halo em cultivo em ALOA[®] e replicação intracelular em células de mamíferos, representando um potencial risco para saúde humana (VOLOKHOV et al., 2007).

Os resultados de JOHNSON et al. (2004) e VOLOKHOV et al. (2007) sugerem que as cepas atípicas de *L. innocua* não se originam de transferência horizontal dos genes de virulência, mas sim, que representem um estágio da evolução de um ancestral comum de *L. monocytogenes* e de *L. innocua*. Isto também é comprovado pela análise filogenética do gênero, a partir de genes como *prs* e 16S rRNA, que resulta em grande proximidade entre estas espécies, o que dificulta sua diferenciação e diagnóstico. Esta dificuldade foi evidenciada nos resultados do presente estudo, nos quais o sequenciamento parcial do *prs* não foi suficiente para distinguir as cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, sendo necessário o sequenciamento completo do 16S rRNA para sua conclusão.

No entanto, em ambos os dendrogramas, as cepas *Lm4* e *Lm33* foram agrupadas com os isolados *Lm28 – 31* num mesmo ramo, sendo que na análise do 16S rRNA estas cepas foram agrupadas com as cepas padrão de *L. monocytogenes*. Este resultado, associado com a origem dessas cepas, seu fenótipo semelhante e a detecção de todos os genes de virulência com as mesmas mutações, sugere que as cepas *Lm4* e *Lm33* sejam, na verdade, isolados de *L. monocytogenes* clonais aos *Lm28 – 31*.

Estes resultados demonstram a fragilidade dos métodos de identificação e diferenciação de *Listeria* mais utilizados na prática laboratorial. Os testes fenotípicos são subjetivos e inconclusivos quando utilizados em cepas atípicas. Já as provas moleculares, o “padrão ouro” PFGE é muito trabalhoso e demorado, sendo utilizado apenas para caracterização epidemiológica de surtos; as técnicas de ribotipagem, AFLP e ERIC-PCR não são conclusivas para espécies e sua reprodutibilidade interlaboratorial não é garantida. A prova molecular rápida, o PCR, depende do gene e dos iniciadores pesquisados. A existência de cepas de *L. innocua* atípicas com os genes *hly* e *plcA* torna impróprio o seu uso para diferenciação das espécies. De forma semelhante, a

identificação de isolados de *L. monocytogenes* com diversas mutações nos principais genes de virulência pesquisados compromete esta técnica de diagnóstico e diferenciação a partir do uso de iniciadores desenvolvidos há mais de uma década.

Dessa forma, propõe-se a pesquisa dos genes *prfA* e *plcB* para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*, utilizando os iniciadores de JOHNSON et al. (2004) e o par *plcB ext* desenvolvido neste estudo, respectivamente. A internalina B também é um fator de virulência exclusivo de *L. monocytogenes*, até o momento, sendo indicados os pares de iniciadores *inlB In – Seq₃* e *inlB Seq₂ – Fim* para sua detecção. No entanto, sua amplificação é mais demorada devido ao seu tamanho e a região de maior complexidade na qual está localizada.

Também foram desenhados e testados iniciadores específicos para mutações já descritas na literatura, como a InlA truncada, e para algumas das identificadas neste estudo, como a deleção do *prfA*; no entanto, os resultados negativos obtidos para estes iniciadores apenas indicam a ausência da mutação em questão, mas não fornecem mais informações sobre o gene pesquisado. Além disso, o número crescente de mutações torna inviável o desenvolvimento e a utilização de iniciadores específicos para cada uma destas, tanto na rotina quanto na pesquisa laboratorial.

Dessa forma, a identificação e diferenciação das espécies de *Listeria* ainda é um tema complexo e trabalhoso, no qual os testes fenotípicos, quando padronizados, fornecem informações importantes que devem ser comprovadas por técnicas moleculares. Estas, por sua vez, devem apresentar alta sensibilidade e especificidade, considerando a possibilidade de ser necessária a triagem de cepas atípicas e mutantes para os fatores de virulência pesquisados.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados pode-se concluir que:

- As cepas ambientais e alimentares de *L. monocytogenes* possuem os genes de virulência estudados, incluindo as cepas com atividade hemolítica fraca;
- As cepas de *L. innocua* com fenótipo atípico apresentaram os genes *plcA*, *inlC* e fragmentos do *hly*;
- Os genes de virulência detectados nas cepas atípicas de *L. monocytogenes* apresentaram diversas mutações e, em sua maioria, alterações na estrutura secundária das respectivas proteínas;
- Propõe-se a pesquisa dos genes *prfA*, *plcB* e *inlB* para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* de forma a evitar o erro de identificação de cepas com fenótipo atípico e mutantes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 16–23.
- Angulo FJ. Listeriosis in the United States. FSIS, USDA. 2009. Disponível em: http://www.fsis.usda.gov/PDF/Lm_Angulo_062309.pdf.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 12, 2 de Janeiro de 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm.
- Assis MA, Destro MT, Franco BDGM, Landgraf M. Incidence of *Listeria* spp. and *Salmonella* spp. in horsemeat for human consumption. *Int J Food Microbiol.* 2000; 62: 161-164.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short Protocols in Molecular Biology.* New York: John Wiley & Sons, 1995.
- Barbalho TCF, Almeida PF, Almeida RCC, Hofer E. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for a rapid test confirmation of suspect colonies. *Food Control.* 2005; 16: 211-216.
- Barros MAF, Nero LA, Manoel AVB, d'Ovídio L, Silva LC, Franco BDGM, Beloti V. *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants. *Braz J Microbiol.* 2007; 38: 603-609.
- Beloil PA, Fravallo P, Chauvin C, Fablet C, Salvat G, Madec F. *Listeria* spp. contamination in piggeries: Comparison of three sites of environmental swabbing for detection and risk factor hypothesis. *J Vet Med.* 2003; 50: 155-160.
- Bierne H, Cossart P. InlB, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and a growth factor. *J Cell Sci.* 2002; 115: 3357-3367.
- Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes Infect.* 2007; 9: 1156-1166.
- Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin MN, Caniaux I, Monget D, Rocourt J. API Listeria, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 1992; 58: 1857-1860.
- Border PM, Howard JJ, Plastrow GS, Siggins KW. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol.* 1990; 11: 158-162.
- Borges MF, Siqueira RS, Bittencourt AM, Vanetti MCD, Gomide LAM. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in salami. *Rev Microbiol.* 1999; 30: 362-4.
- Braun L, Ohayon H, Cossart P. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1998; 27: 1077-1087.

Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: The William and Wilkins Co; 1948.

Brito JRF, Santos EMP, Arcuri EF, Lange CC, Brito MAVP, Souza GN, Cerqueira MMPO, Beltran JMS, Call JE, Luchansky JB. Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 4954-4961.

Brooks J, Daneshvar M, Malcolm G, Pine L. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol*. 1989; 35: 245-54.

Bubert A, Riebe J, Schnitzler N, Schönberg A, Goebel W, Schubert P. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 and/or PCR. *J Clin Microbiol*. 1997; 35: 179-83.

Buchan DW, Ward SM, Lobley AE, Nugent TC, Bryson K, Jones DT. Protein annotation and modelling servers at University College London. *Nucl Acids Res*. 2010; 38: 563-568.

Buchrieser C, Cossart P, Kunst F, Glaser P, Rusniok C. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immun Med Microbiol*. 2003; 35: 207-213.

Bueno VF, Banerjee P, Banada PP, Mesquita AJ, Lemes-Marques EG, Bhunia AK. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and *in vitro* cell culture assays. *Int J Environm Health Res*. 2010; 20: 43-59.

Campos LC. *Listeria monocytogenes*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 235-242.

CDC – Center for Disease Control. Investigation Update: multistate outbreak of listeriosis linked to whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado. 2011a. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms>.

CDC – Center for Disease Control. Outbreak of invasive listeriosis associated with the consumption of Hog Head Cheese – Louisiana, 2010. *Morb Mort Weekly Report*. 2011b; 60: 401-405.

CDC – Center for Disease Control. *Listeria / Listeriosis – Diagnosis*. 2011c. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/diagnosis.html>.

CDC – Center for Disease Control. 2012 Supplement to *Clinical Infectious Diseases - Studies From the Foodborne Diseases Active Surveillance Network*. *Clin Infect Dis*. 2012a; 54(5): doi:10.1093/cid/cis482.

CDC – Center for Disease Control. Multistate outbreak of listeriosis linked to imported Frescolina Marte brand ricotta salata cheese (Final Update). 2012b. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>.

- Chasseignaux E, Toquin MT, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J Appl Microbiol.* 2001; 91: 888-899.
- Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D, Fang W. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* 2009; 26: 103–111.
- Chiarini E, Tyler K, Farber JM, Pagotto F, Destro MT. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: Manual and automatic evisceration. *Poult Sci.* 2009; 88: 791-797.
- Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vazquez-Boland JA. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 2002; 99: 431-436.
- Cossart P, Lecuit M. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement. Bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J.* 1998; 17: 3797–3806.
- Cossart P, Pizarro-Cerda J, Lecuit M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 23-31.
- Cruz CD, Martinez MB, Destro MT. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim Nutr.* 2008a; 19: 195-206.
- Cruz CD, Silvestre FA, Kinoshita EM, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in a gravlax salmon processing line. *Braz J Microbiol.* 2008b; 39: 375-383.
- Degenhardt R, Sant'Anna ES. Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. *Braz J Microbiol.* 2007; 38: 309-314.
- den Bakker HC, Bundrant BN, Fortes ED, Orsi RH, Wiedmann M. A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 6085-6100.
- Destro MT, Serrano AM, Kabuki DY. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control.* 1991; 2: 110-112.
- Destro M.T, Leitão MFF, Farber JM. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62: 705–711.
- Doumith M, Cazalet C, Simoes N, Frangeul L, Jacquet C, Kunst F, Martin P, Cossart P, Glaser P, Buchrieser C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun.* 2004; 72: 1072–1083.

Duval EH, Lima AS, Gandra EA, Araújo MR, Macedo MRP, Silva WP. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em matéria-prima suína utilizada na produção de linguiça frescal. In: Anais XI Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos. 2003; 2: 67-68.

EFSA – European Food Safety Authority. EFSA and ECDC zoonoses report shows *Salmonella* in humans falls for fifth consecutive year. 2011. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/zoonoses110322.htm>.

Engelbrecht F, Chun SK, Ochs C, Hess J, Lottspeich F, Goebel W, Sokolovic Z. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol.* 1996; 21: 823-837.

Esper MRNR, Pessoa GVA, Hofer E, Lee IML, Melles CEA, Sakata EE, Calzada CT. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 1978; 38: 37-41.

Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991; 55: 476-511.

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol.* 1981; 17: 368–376.

Ferronato AI. Contaminação de carcaças e ambiente por *Listeria* sp. em diferentes etapas do abate de suínos. Instituto de Ciências Básicas da Saúde - UFRGS. Dissertação de mestrado. 2010.

Freitag NE, Rong L, Portnoy DA. Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cells spread. *Infect Immun.* 1993; 61: 2537–2544.

Freitag NE, Port GC, Miner MD. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 623-628.

Fretz R, Sagel U, Ruppitsch W, Pietzka AT, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Pichler J, Much P, Pfaff G, Stark K, Prager R, Flieger A, Feenstra O, Allerberger F. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese ‘Quargel’, Austria and Germany 2009. *Euro Surveill.* 2010; 15: 1-2.

Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, Weaver RE, Gaventa S, Mascola L. Listerioses Study Group. The epidemiology of listerioses in the United States – 1986. *Am J Epidemiol.* 1991; 133: 392-401.

Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendevre JL, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *Int J Food Microbiol.* 1999; 53: 127-140.

Glaser P, Frangeul L, Buchrieser C, Rusniok C, Amend A, Baquero F, Berche P, Bloecker H, Brandt P, Chakraborty T, Charbit A, Chetouani F, Couve E, de Daruvar A, Dehoux P, Domann E, Dominguez-Bernal G, Duchaud E, Durant L, Dussurget O, Entian KD, Fsihi H, Garcia-del Portillo F, Garrido P, Gautier L, Goebel W, Gomez-

- Lopez N, Hain T, Hauf J, Jackson D, *et al.* Comparative genomics of *Listeria* species. *Science*. 2001; 294: 849-852.
- Glomski IJ, Decatur AL, Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize Listeriolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. *Infect Immun*. 2003; 6754–6765.
- Goldfine H, Knob C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infect Immun*. 1992; 60: 4059-4067.
- Goldfine H, Johnston NC, Knob C. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. *J Bacteriol*. 1993; 175: 4298-4306.
- Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H, Desenclos JC. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clin Infect Dis*. 2011. Doi: 10.1093/cid/cir902.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, den Bakker HC, Wiedmann M, Swaminathan B, Sauders BD. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Intern J Syst Evolut Microb*. 2010; 60: 1280–1288.
- Gray MJ, Zadoks RN, Fortes ED, Dogan B, Cai S, Chen Y, Scott VN, Gombas DE, Boor KJ, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl Environ Microbiol*. 2004; 70: 5833–5841.
- Gray ML, Killinger AH. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev*. 1966; 30: 309-382.
- Grenningloh R, Darji A, Wehland J, Chakraborty T, Weiss S. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1997; 65: 3976-3980.
- Guerra MM, Bernardo F, McLauchlin J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Syst Appl Microbiol* 2002; 25: 456–461.
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneë MF, Bielecka MK, Scortti M, Disson O, Berche P, Vazquez-Boland J, Lortholary O, Lecuit M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 136–138.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Sym Series*. 1999; 41: 95-98.
- Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4: 423-434.
- Hitchins AD, Jinneman K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Jackson GJ, coordinator. *Bacteriological Analytical Manual*. 8. ed. Gaithersburg: AOAC International; (1998) Revision A / 2011.

Hofer E, Nascimento RS, Oliveira MA. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. Rev Soc Bras Med Trop. 1998; 31: 173-177.

Hofer E, Reis CMF, Hofer CB. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. Rev Soc Brasil Med Trop. 2006; 39: 32-37.

Hong E, Doumith M, Duperrier S, Giovannacci I, Morvan A, Glaser P, Buchrieser C, Jacquet C, Martin P. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. Int J Food Microbiol. 2007; 114: 187–194.

Jacquet C, Catimel B, Brosch R, Buchrieser C, Dehaumont P, Goulet V, Lepoutre A, Veit P, Roucort J. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. Appl Environ Microbiol. 1995; 57: 2109-2113.

Jeffers GT, Bruce JL, McDonough P, Scarlett J, Boor KJ, Wiedmann, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. Microbiology. 2001; 147: 1095–1104.

Johnson J, Jinneman K, Stelma G, Smith BG, Lye D, Messer J, Ulaszek J, Evsen L, Gendel S, Bennett RW, Swaminathan B, Pruckler J, Steigerwalt A, Kathariou S, Yildirim S, Volokhov D, Rasooly A, Chizhikov V, Wiedmann M, Fortes E, Duvall RE, Hitchins AD. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Appl Environ Microbiol. 2004; 70: 4256–4266.

Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. J Mol Biol. 1999; 292: 195-202.

Jung YS, Frank JF, Brackett RE, Chen J. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* in frankfurters using oligonucleotide primers targetting the genes encoding internalin AB. J Food Prot. 2003; 66: 237– 241.

Jurado R, Farley MM, Pereira E. Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection. Clin Infect Dis. 1993; 17: 224-227.

Keto-Timonen RO, Autio TJ, Korkeala HJ. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. Syst Appl Microbiol. 2003; 26: 236–244.

Khan MA, Seaman A, Woodbine M. *Listeria monocytogenes* haemolysin: lecithinase. Acta Microbiol Acad Sci Hung. 1972; 19: 341-352.

Kreft J, Vazquez-Boland JA. Regulation of virulence genes in *Listeria*. Int J Med Microbiol. 2001; 291: 145-157.

Lachica RV. Hemolytic activity reevaluation of putative nonpathogenic *Listeria monocytogenes* strains. Appl Environ Microbiol. 1996; 62: 4293–4295.

Laciar A, Vaca L, Lopresti R, Vega A, Mattana C, Centorbi ONP. DNA fingerprinting by ERIC-PCR for comparing *Listeria* spp. strains isolated from different sources in San Luis, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38: 55-60.

Leal NC, Hofer E, Costa MF, Sá AT. Isolamento de *Listeria monocytogenes* em líquido cefalorraquidiano em Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Microbiol.* 1983; 14: 280-291.

Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PAD, Le Flèche-Matéos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiaae* sp. nov. *Intern J Syst Evol Microb.* 2009; 60: 2210-2214.

Lemes-Marques EG, Cruz CD, Destro MT. Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2007; 38: 287-292.

Liu D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 645-659.

Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. *J Med Microbiol.* 2003; 52: 1066–1070.

Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. *Int J Food Microbiol.* 2007; 118: 101-115.

Lomonaco S, Decastelli L, Nucera D, Gallina S, Bianchi DM, Civera T. *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: Subtypes, diversity and persistence over time. *Int J Food Microbiol.* 2009; 128: 516–520.

Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis.* 1996; 24: 1-11.

Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* 1997; 153: 9-29.

Lukinmaa S, Miettinen M, Nakari UM, Korkeala H, Siitonen A. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and genotypes during an 11-year period in Finland. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:1694–1700.

Lundén JM, Miettinen MK, Autio TJ, Korkeala H.J. Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times. *J Food Prot.* 2000; 63: 1204-1207.

Mantilla SPS, Franco RM, Oliveira LAT, Santos EB, Gouvêa R. Occurrence of *Listeria* spp. in bovine ground meat samples commercialized in Niterói, RJ, Brazil. *Ciênc Agrotec.* 2007; 31: 1225-1230.

Martins EA, Germano PML. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control.* 2011; 22: 297-302.

Martins IS, Faria FCC, Miguel MAL, Dias MPSC, Cardoso FLL, Magalhães ACG, Mascarenhas LA, Nouér SA, Barbosae AV, Vallim DC, Hofer E, Rebello RF, Riley LW, Moreira BM. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. *Am J Infect Control*. 2010; 38: e31–e36. doi:10.1016/j.ajic.2010.02.014.

McLauchlin J. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol Infect*. 1990; 104: 181-189.

McLauchlin J, Rees CED. Genus I. *Listeria*. In: De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB, eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2. ed. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer; 2009. v. 3, p. 244-257.

Mead PS, Slutsker L, Dietz V, Mccaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infection Disease*. 1999; 5: 607–625.

Mengaud J, Ohayon H, Gounon P, Mege RM, Cossart P. E-Cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. 1996; 84: 923-932.

Miner M, Port G, Freitag N. Functional impact of mutational activation on the *Listeria monocytogenes* central virulence regulator PrfA. *Microbiology*. 2008; 154: 3579–3589.

Miyasaki KN, Chiarini E, Sant'Ana AS, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguíça, a Brazilian fresh pork sausage. *Meat Science*. 2009; 83: 523-527.

Mook P, O'Brien SJ, Gillespie IA. Concurrent conditions and human listeriosis, England, 1999–2009. *Emerg Infect Dis*. 2011. Disponível em: www.cdc.gov/EID/content/17/1/38.htm.

Murray EGD, Webb RA, Swan MBR. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J Pathol Bacteriol*. 1926; 29: 407-439.

Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980; 8: 4321-4325.

Murray PR, Baro EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. *Manual of clinical microbiology*. 7. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1999.

Nascimento MGF, Cullor JS. Listeriose humana - epidemiologia e fontes de contaminação. *Rev Hig Alim*. 1994; 8: 13-17.

Nes F, Riboldi GP, Frazzon APG, d'Azevedo PA, Frazzon J. Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010; 43: 382-385.

Nieman RE, Lorber B. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect Dis*. 1980; 2: 207-227.

Norberg AN, Maure EAP, Svaiteir N, Gonçalves AS, Sanches FG. *Listeria monocytogenes* in Hiv-Infected patients in a hospital of Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil. *J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2005; 11: 601-604.

Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301: 79–96.

Paixão R. Caracterização de *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* isoladas em abatedouros e cortes de carne suína no Estado de São Paulo e sua comparação com isolados de casos clínicos em humanos. FMVZ - USP. Dissertação de mestrado. 2010.

Parihar VS, Lopez-Valladares G, Danielsson-Tham ML, Peiris I, Helmersson S, Unemo M, Andersson B, Arneborn M, Bannerman E, Barbuddhe S, Bille J, Hajdu L, Jacquet C, Johansson C, Löfdahl M, Möllerberg G, Ringberg H, Rocourt J, Tjernberg I, Ursing J, Henriques-Normark B, Tham W. Characterization of human invasive isolates of *Listeria monocytogenes* in Sweden 1986-2007. *Foodborne Pathog Dis.* 2008; 5: 755-761.

Perrin M, Bemer M, Delamare C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003; 5308–5309.

Portnoy DA, Chakraborty T, Goebel W, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun.* 1992; 60: 1263–1267.

Rajabian T, Gavicherla B, Heisig M, Müller-Altrock S, Goebel W, Gray-Owen S, Ireton K. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat Cell Biol.* 2009; 11: 1212-1218.

Ripio MT, Dominguez-Bernal G, Lara M, Suarez M, Vazquez-Boland JA. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol.* 1997; 179: 1533–1540.

Rivero GA, Torres HA, Rolston KVI, Kontoyiannis DP. *Listeria monocytogenes* infection in patients with cancer. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47: 393–398.

Roberts AJ, Wiedmann M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60: 904–918.

Roche SM, Gracieux P, Albert I, Gouali M, Jacquet C, Martin PM, Velge P. Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2003; 71: 3429–3436.

Roche SM, Gracieux P, Milohanic P. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 6039–6048.

Roche SM, Grépinet O, Corde Y, Teixeira AP, Kerouanton A, Témoin S, Mereghetti L, Brisabois A, Velge P. A *Listeria monocytogenes* strain is still virulent despite nonfunctional major virulence genes. *J Infect Dis.* 2009; 200: 1944–1948.

Rocourt J, Seeliger HPR. Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene.* 1985; 259: 317–330.

Rocourt J, Hof H, Schrettenbrunner A, Malinverni R, Bille J. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz Med Wochenschr.* 1986; 116: 248-251.

Rodriguez LD, Vazquez-Boland JA, Garayzabal JFF, Tranchant PE, Gomez-Lucia E, Ferri EFR, Fernandez GS. Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of *Listeria* strains. *J Clin Microbiol.* 1986; 24: 99.

Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* New York: Marcel Dekker Inc, 1991. p. 632.

Rzhetsky A, Nei M. A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol.* 1992; 9: 945-967.

Safdar A, Armstrong D. Listeriosis in patients at a comprehensive cancer center, 1955–1997. *Clin Infect Dis.* 2003; 37: 359–364.

Schlech WF. Foodborne Listeriosis. *Clin Infect Dis.* 2000; 31: 770–775.

Schlech WF, Lavigne PM, Botolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *N Engl J Med.* 1983; 308: 203-206.

Schwab JP, Eddelweiss MIA. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. *J Bras Patol Med Laborat.* 2003; 39: 111-114.

Scortti M, Monzo HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vazquez-Boland JA. The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* 2007; 9: 1196-1207.

Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth Microbiol.* 1979; 13: 31-49.

Sigrist CJA, Cerutti L, de Castro E, Langendijk-Genevaux PS, Bulliard V, Bairoch A, Hulo N. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 161-166.

Silva MCD, Destro MT, Hofer E, Tibana A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. *Int J Food Microbiol.* 2001; 63: 2075-2080.

Silva WP, Von Laer AE, Lima AS, Techera SBC, Mata MM, Jantzen MM. Status higiênico-sanitário de queijos do tipo Minas produzidos de forma artesanal e comercializados em Pelotas, RS. *Rev Inst Lat Cândido Tostes.* 2006; 61: 37-42.

Skalka B, Smola J, Elischerova K. Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. J Clin Microbiol. 1982; 15: 503-507.

Skalka B, Smola J, Elischerová K. Hemolytic phenomenons under the cultivation of *Listeria innocua*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A. 1983; 253: 559–565.

Snapir YM, Vaisbein E, Nassar F. Low virulence but potentially fatal outcome - *Listeria ivanovii*. Eur J Intern Med. 2006; 17: 286-287.

Souza VM, Alves VF, Destro MT, De Martinis ECP. Quantitative evaluation of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed surubim fish (*Pseudoplatystoma* sp). Braz J Microbiol. 2008; 39: 527-528.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. Mol Biol Evol. 1992; 9: 678-687.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. Mol Biol Evol. 2011; 28: 2731-2739.

Témoin S, Roche SM, Grépinet O, Fardini Y, Velge P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. Microbiology. 2008; 154: 939-948.

Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. Syst Appl Microbiol. 2001; 24: 520–538.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acid Res. 1994; 22: 4673-4680.

Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehlan J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev. 2001; 14: 584–640.

Volokhov DV, Duperrier S, Neverov AA, George J, Buchrieser C, Hitchins AD. The Presence of the Internalin Gene in Natural Atypically Hemolytic *Listeria innocua* Strains Suggests Descent from *L. monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 2007; 73: 1928-1939.

Wiedmann M. Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*. J AOAC Int. 2002; 85: 524-532.

Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect Immun. 1997; 65: 2707-2716.

Wong KK, Freitag NE. A novel mutation within the central *Listeria monocytogenes* regulator PrfA that results in constitutive expression of virulence gene products. J Bacteriol. 2004; 186: 6265–6276.

9. ANEXOS

Anexo 1 - Lista de iniciadores desenvolvidos neste estudo para pesquisa de genes de virulência *inlA*, *inlB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *prfA*, *inlC* e *inlJ*.

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)
<i>inlB-In Fw</i>	GTGAAAGAAAAGCAC	462
<i>inlB-In Rv</i>	TATACCATTATGCTC	
<i>inlB-Fim Fw</i>	ACTGTTGATAGAGAA	587
<i>inlB-Fim₁ Rv</i>	TTATTTCTGTGCCCT	
<i>inlB-Fim₂ Rv</i>	TCATTTCTGTGCCCT	
<i>inlB-Fim₃ Rv</i>	TNATTTCTGTGCCCT	
<i>inlB-Detec Fw</i>	ATTAGTGATATTGTG	391
<i>inlB-Detec Rv</i>	CATAACTTACTGTGT	
<i>inlB-Seq₂ Fw</i>	TGATGGAACGGTAAT	-
<i>inlB-Seq₃ Rv</i>	ATTCCCGCGAATATA	
<i>inlB-Seq₁ Rv</i>	TAAAACATCTAGATT	
<i>inlB-ext Fw</i>	GCTAGATGTGGTTTTTCGGACT	2146
<i>inlB-ext Rv</i>	TAAGCAGCGCAAAGGTGATTCCTAC	
<i>inlA-Detec Fw</i>	AAGTGATATAACTCC	477
<i>inlA-Detec Rv</i>	TGGTGTAAGATCGCT	
<i>inlA-In₁ Fw</i>	GTGAGAAGAAAACGA	409
<i>inlA-In₂ Fw</i>	GTGAGAAAAAAAACGA	
<i>inlA-In₃ Fw</i>	GTGAGAAAAAAAACG	
<i>inlA-In Rv</i>	GAGTTATATCTGCTA	
<i>inlA-Fim Fw</i>	AAGCCGGATATACTT	403
<i>inlA-Fim Rv</i>	CTATTTACTAGCACG	
<i>inlA-Seq₂ Fw</i>	TTCATGTGGACGGCA	-
<i>inlA-Seq₃ Fw</i>	AAGATATAGGCACAT	
<i>inlA-Seq₃ Rv</i>	GTTGCTGTGTAGCTG	
<i>inlA-Seq₁ Rv</i>	TAACTCAGTTAGTT	
<i>inlA-ext Fw</i>	CGGCTCCGTAGACAGATTAG	2884
<i>inlA-ext Rv</i>	GTGATAGTCTCCGCTTGAC	

In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento. Células em destaque rosa - Iniciadores propostos para detecção dos genes *inlB* e *plcB* para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Anexo 1 (continuação)

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)
<i>hly-In Fw</i>	ATGAAAAAAAAATAATG	692
<i>hly-In Rv</i>	CTATTATTTACAGCT	
<i>hly-Fim Fw</i>	CCTCCTGCATATATC	725
<i>hly-Fim Rv</i>	TTATTCGATTGGATT	
<i>hly-Detec Fw</i>	TAACAACGCAGTAAA	566
<i>hly-Detec Rv</i>	CGTAAGTCTCCGAGG	
<i>hly-Seq₂ Fw</i>	AATTGTTCAACATAA	-
<i>hly-Seq₁ Rv</i>	TAATTCCGAATTCGC	
<i>hly-ext Fw</i>	CGATAAAGGGACAGCAGGACT	1796
<i>hly-ext Rv</i>	AGCCTGTTTCTACATTCTTCACAA	
<i>plcA-In₁ Fw</i>	TTGTATAAGAATTAT	578
<i>plcA-In₂ Fw</i>	TTGTATAAGATTTAT	
<i>plcA-In Rv</i>	TTCCGCGGACATCTT	
<i>plcA-Fim Fw</i>	AGATGACTACAATGG	279
<i>plcA-Fim Rv</i>	TTAGTTGAATTTATT	
<i>plcA-Detec Fw</i>	AACCATTATTATGCG	396
<i>plcA-Detec Rv</i>	TGCAGCATACTGACG	
<i>plcA-Seq₁ Rv</i>	TCTAATATCGATGTA	-
<i>plcA-ext Fw</i>	GAGGTTGCTCGGAGATATAC	1100
<i>plcA-ext Rv</i>	CTGCTGTCCCTTTATCGTCG	
<i>plcB-In₁ Fw</i>	ATGTGCTTGACCGCA	579
<i>plcB-In₂ Fw</i>	ATGTGCTTGANCGCA	
<i>plcB-In Rv</i>	GGTATCTACGTAATT	
<i>plcB-Fim Fw</i>	ATTACCGAGAAGGGA	418
<i>plcB-Fim Rv</i>	TTATTCATTTGTTTT	
<i>plcB-Detec Fw</i>	TCCATATTATGATAC	341
<i>plcB-Detec Rv</i>	ACGTCATCTGAGCAA	
<i>plcB-Seq₁ Rv</i>	TAAATTAGCTCGCAT	-

In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento. Células em destaque rosa - Iniciadores propostos para detecção dos genes *inlB* e *plcB* para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Anexo 1 (continuação)

Iniciador	Sequência 5' - 3'	Produto (pb)
<i>plcB-ext Fw</i>	CCATACGACGTTAATTCTTGCAATG	1039
<i>plcB-ext Rv</i>	TATCCACCCGCTAACGAGTG	
<i>inlC-In₁ Fw</i>	ATGCTAGTNTTAATTGTA	546
<i>inlC-In₂ Fw</i>	ATGCTAGTGTTAATTGTA	
<i>inlC-In Rv</i>	TATTTTCATTACCATGCAA	
<i>inlC-Fim Fw</i>	ATTCCAAGTGCTTGT	485
<i>inlC-Fim₁ Rv</i>	CTAATTCTGAATAGGTTGTA	
<i>inlC-Fim₂ Rv</i>	CTAATTCTTGATAGGTTGTG	
<i>inlC-Fim₃ Rv</i>	CTAGTTTCTCAAAGGCTGTA	
<i>inlC-Detec Fw</i>	ATGGAGATAATAGCAACA	425
<i>inlC-Detec Rv</i>	CTGGTTCATTCACACATT	
<i>inlJ-In Fw</i>	TTGAAAACACTACTAAA	439
<i>inlJ-In Rv</i>	TATTTGAATCACATGCCAGA	
<i>inlJ-Fim Fw</i>	ACAATAGGAGATAACTAC	536
<i>inlJ-Fim Rv</i>	CTATTTTTTCTTTTTCCAGA	
<i>inlB-Seq₁ Rv</i>	TAGATACATCTAATTCAG	-
<i>inlJ-Seq₂ Fw</i>	CAGATTATACATTAACGA	
<i>inlJ-Seq₃ Fw</i>	ACAACCTTAGACTGTAGC	
<i>inlJ-Seq₃ Rv</i>	ACGTATAGCCTTCGATAGTT	
<i>inlJ-ext Fw</i>	CACAATCAAGTCACATATCTCC	2731
<i>inlJ-ext Rv</i>	CTATCCAAGTGGAAGAAGATTGAA	
<i>prfA-In Fw</i>	ATGAACGCTCAAGCA	715
<i>prfA-Fim Rv</i>	TTAATTTAATTTTCCCCAAG	
<i>prfA-detec Fw</i>	CTGCTAACAGCTGAGCTATG	404
<i>prfA-detec Rv</i>	GCTACCGCATACGTTATC	

In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento. **Células em destaque rosa** - Iniciadores propostos para detecção dos genes *inlB* e *plcB* para diferenciar as espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Anexo 2 - Resultados encontrados para os iniciadores propostos para amplificação dos genes de virulência nas cepas estudadas.

Cepa	Espécie	Origem	ALOA	Hemólise	inlC		prfA		plcA		plcB	inlB			inlA			hly				inlJ		
					Liu	In - Fim	Johnson	Johnson - Fim	ext	Detec	ext	ext	In - Seq ₃	Seq ₂ . Fim	ext	In - Detec	inlAB_Jung	ext	Detec	Border	Fim	Liu	ext	
Lm1	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm2	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm3	<i>L. mono</i>	Merc 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	**Banda inespcf	+	+	+	+	+	+	-	
Lm21	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm22	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm23	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm25	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm26	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm27	<i>L. mono</i>	AB 1	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm28	<i>L. mono</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+	*Banda inespcf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Lm29	<i>L. mono</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lm30	<i>L. mono</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lm31	<i>L. mono</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lm34	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm35	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	**Banda inespcf	+	+	+	+	+	+	+	
Lm36	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Lm37	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	**Banda inespcf	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Lm38	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
Lm39	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm39a ¹	<i>L. mono</i>	Humana	S/ halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	
Lm40	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	**Banda inespcf	+	+	+	**Banda inespcf	+	+	+	+	+	+	+	
Lm41	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm42	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lm43	<i>L. mono</i>	Humana	Halo	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

1 - Halo sutil no ALOA[®]; 2 - Hemólise positiva muito fraca; *L. mono* – *L. monocytogenes*; *L. innoc* – *L. innocua*; AB1 – Abatedouro 1; AB2 – Abatedouro 2; Merc 1 – Mercado 1; Merc 2 – Mercado 2; S/ halo – Crescimento sem halo no ALOA[®]; + frc – positivo fraco; + Forte – positivo forte; * Banda inespcf: banda inespecífica de tamanho menor que o esperado não relacionada com gene; ** Banda inespcf: banda inespecífica de tamanho menor que o esperado relacionada com gene. Liu - Iniciadores publicados por LIU et al. (2007); Johnson - Iniciadores publicados JOHNSON et al. (2004); inLAB_Jung - Iniciadores publicados por JUNG et al. (2003); Border - Iniciadores publicados por BORDER et al. (1990). In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento.

Anexo 2 (continuação)

Cepa	Espécie	Origem	ALOA	Hemólise	<i>inlC</i>		<i>prfA</i>		<i>plcA</i>		<i>plcB</i>	<i>inlB</i>			<i>inlA</i>			<i>hly</i>				<i>inlJ</i>	
					Liu	In - Fim	Johnson	Johnson - Fim	ext	Detec	ext	ext	In - Seq ₃	Seq ₂ - Fim	ext	In - Detec	inlAB_Jung	ext	Detec	Border	Fim	Liu	ext
Lin5	<i>L. innoc</i>	Merc 1	Halo ¹	+ frc ²	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Lin6	<i>L. innoc</i>	AB 2	Halo ¹	+ frc ²	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Lin7	<i>L. innoc</i>	AB 2	Halo ¹	+ frc ²	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Lin8	<i>L. innoc</i>	AB 2	Halo ¹	+ frc ²	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Lin9	<i>L. innoc</i>	AB 2	Halo ¹	+ frc ²	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Lm4	<i>L. innoc</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+	*Banda inespcf	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lm33	<i>L. innoc</i>	Merc 2	Halo	+ frc	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Lin16	<i>L. innoc</i>	AB 1	S/halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lin17	<i>L. innoc</i>	AB 1	S/halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lin18	<i>L. innoc</i>	AB 1	S/halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lin19	<i>L. innoc</i>	AB 1	S/halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lin20	<i>L. innoc</i>	AB 1	S/halo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lm10	<i>L. mono</i>	ATCC 19115	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lm15	<i>L. mono</i>	ATCC 19111	Halo	+ Forte	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lin11	<i>L. innoc</i>	ATCC 33090	S/halo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lin46	<i>L. innoc</i>	CLIP 12612	S/halo	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 - Halo sutil no ALOA[®]; 2 - Hemólise positiva muito fraca; *L. mono* – *L. monocytogenes*; *L. innoc* – *L. innocua*; AB1 – Abatedouro 1; AB2 – Abatedouro 2; Merc 1 – Mercado 1; Merc 2 – Mercado 2; S/ halo – Crescimento sem halo no ALOA[®]; + frc – positivo fraco; + Forte – positivo forte; * Banda inespcf: banda inespecífica de tamanho menor que o esperado não relacionada com gene. Liu - Iniciadores publicados por LIU et al. (2007); Johnson - Iniciadores publicados JOHNSON et al. (2004); inlAB_Jung - Iniciadores publicados por JUNG et al. (2003); Border - Iniciadores publicados por BORDER et al. (1990). In - Iniciadores correspondentes ao início do gene; Fim - Iniciadores correspondentes ao final do gene; Detec - Iniciadores internos desenvolvidos para detecção do gene; ext – Iniciadores externos ao gene; Seq – Iniciadores internos desenvolvidos para sequenciamento.

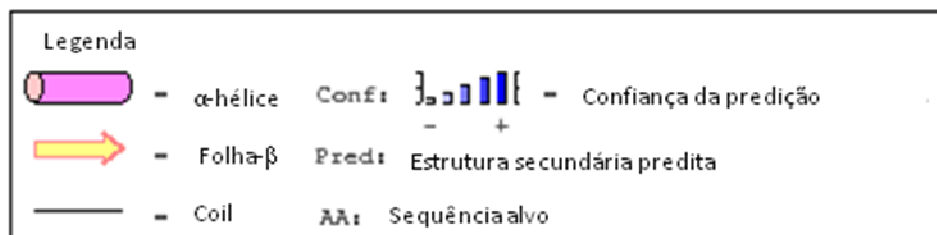
Anexo 3 – Informações das sequências retiradas do GenBank e utilizadas nas análises comparativas dos genes de virulência e de identificação de espécie.

Cepa	Espécie	Gene	Nº Acesso GenBank
EGD-e	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i> <i>inlB</i> <i>inlC</i> <i>plcA</i> <i>plcB</i> <i>hly</i> <i>prfA</i> <i>16S rRNA</i> <i>prs</i>	NC_003210.1 (genoma completo)
08-5578	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i> <i>inlB</i> <i>inlC</i> <i>plcA</i> <i>plcB</i> <i>hly</i> <i>prfA</i> <i>prs</i>	NC_013766.1 (genoma completo)
08-5923	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i> <i>inlB</i> <i>inlC</i> <i>plcA</i> <i>plcB</i> <i>hly</i> <i>prfA</i>	NC_013768.1 (genoma completo)
CNL895795	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlB</i> <i>plcA</i>	EF990801 AY367411
CNL895807	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlB</i> <i>plcA</i>	EF990798 AY367410
A23	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlB</i> <i>plcA</i>	FJ932481 FJ932480
ATCC 19115	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i> <i>16S rRNA</i>	EU295337 JF967624.1
SLCC2378	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlC</i>	NC_018585.1
SLCC2540	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlC</i>	NC_018586.1
SLCC7179	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlC</i>	NC_018593.1
SLCC5850	<i>L. monocytogenes</i>	<i>plcB</i>	NC_018592.1
F2365	<i>L. monocytogenes</i>	<i>inlA</i>	NC_002973.6
FSL E1-041	<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	EU521400

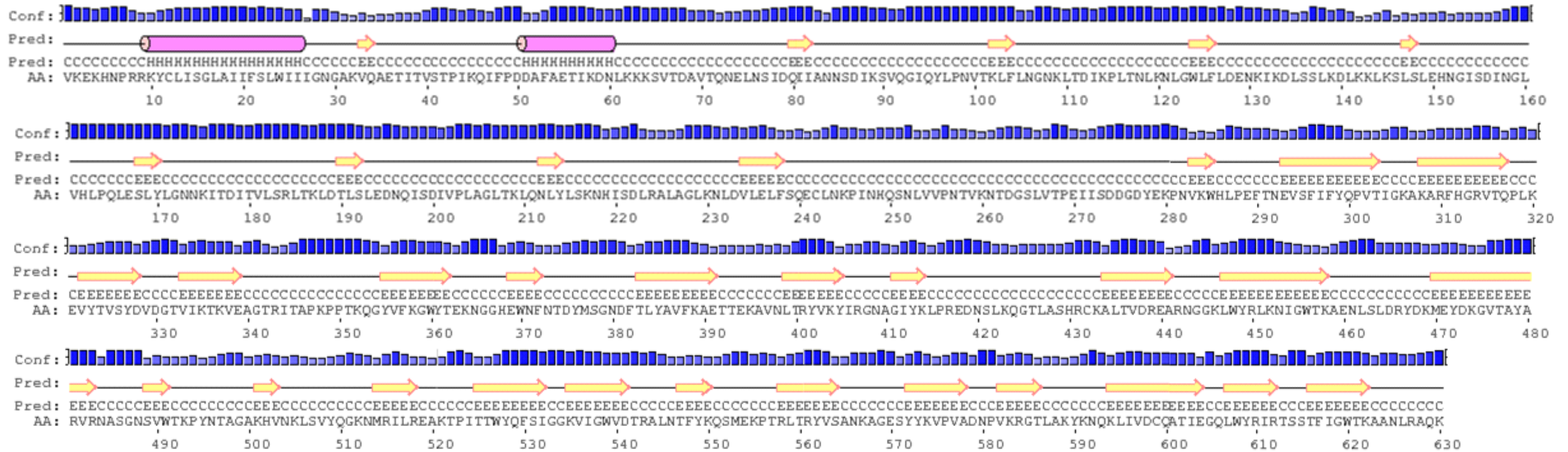
Anexo 3 (continuação)

Cepa	Espécie	Gene	Nº Acesso GenBank
CLIP 81459	<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	NC_012488.1
FSL F2-030	<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	EU521417.1
M7	<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	NC_017537.1
FSL W1-110	<i>L. monocytogenes</i>	<i>prs</i>	AF497227.1
ScottA	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S Rrna</i>	NZ_CM001159.1
H3597	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545985.1
H3598	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545984.1
H3599	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545987
H3508	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545986
NCTC 10357	<i>L. monocytogenes</i>	<i>16S rRNA</i>	NR_044823.1
FSL R2-604	<i>L. innocua</i>	<i>prs</i>	FJ692323.1
FSL C2-008	<i>L. innocua</i>	<i>prs</i>	AY135439.1
CLIP 11262	<i>L. innocua</i>	<i>prs</i>	NC_003212.1
NCTC 11288	<i>L. innocua</i>	<i>16S rRNA</i>	U57915
ATCC 33090	<i>L. innocua</i>	<i>16S rRNA</i>	JF967625.1
FSL S4-696	<i>L. marthii</i>	<i>prs</i>	FJ692327.1
FSL S4-120	<i>L. marthii</i>	<i>prs</i>	FJ692326.1
NR-9579	<i>L. marthii</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545982.1
NR-9580	<i>L. marthii</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545980.1
NR-957T	<i>L. marthii</i>	<i>16S rRNA</i>	EU545982.1
SLCC 3954	<i>L. seeligeri</i>	<i>prs</i>	NC_013891.1
FSL N1-067	<i>L. seeligeri</i>	<i>prs</i>	AY135435.1
FSL N1-079	<i>L. seeligeri</i>	<i>prs</i>	AY135436.1
SLCC 3954	<i>L. seeligeri</i>	<i>prs</i>	AJ249807.1
ATCC 35967	<i>L. seeligeri</i>	<i>16S rRNA</i>	NR_043518.1
NCTC 11856	<i>L. seeligeri</i>	<i>16S rRNA</i>	X56148
FSL C2-006	<i>L. welshimeri</i>	<i>prs</i>	AY135442.1
SLCC 5334	<i>L. welshimeri</i>	<i>prs</i>	NC_008555.1
FSL N1-064	<i>L. welshimeri</i>	<i>prs</i>	AY135441.1
ATCC 35897	<i>L. welshimeri</i>	<i>16S rRNA</i>	NR_043519.1
PAM55	<i>L. ivanovii</i>	<i>prs</i>	NC_016011.1
ATCC 19119	<i>L. ivanovii</i>	<i>prs</i>	AJ249806.1
FSL C2-010	<i>L. ivanovii</i>	<i>prs</i>	AY135438
FSL C2-011	<i>L. ivanovii</i>	<i>prs</i>	AY135437.1
CLIP 12229T	<i>L. ivanovii</i>	<i>16S rRNA</i>	NR_036809.1
CLIP 12510T	<i>L. ivanovii</i>	<i>16S rRNA</i>	NR_036808.1
CLIP 12150	<i>L. ivanovii</i>	<i>16S rRNA</i>	X98528
DSM 20601	<i>L. grayi</i>	<i>prs</i>	CCC58625.1
DSM 22097	<i>L. rocourtiae</i>	<i>prs</i>	CCC58626.1
CLIP 109804T	<i>L. rocourtiae</i>	<i>16S rRNA</i>	FJ557241.1
NCTC 10812	<i>L. murrayi</i>	<i>16S rRNA</i>	X56154

Anexo 4 – Resultados encontrados para a predição das estruturas secundárias das proteínas estudadas (InlC, PI-PLC, PC-PLC, InlA, InlB e Hly).



InIB 08-5578 / 08-5923



InIBA23

