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

Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos crus comercializados no município de São Paulo

Ruth Estela Gravato Rowlands

VERSÃO CORRIGIDA

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco

São Paulo

2013

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

R883c	<p>Rowlands, Ruth Estela Gravato</p> <p>Caracterização fenotípica e genotípica de <i>Listeria monocytogenes</i> isoladas de produtos cárneos crus refrigerados comercializados no Município de São Paulo / Ruth Estela Gravato Rowlands. -- São Paulo, 2013.</p> <p>121p.</p> <p>Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental</p> <p>Orientador : Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo</p> <p>1. Microbiologia de alimentos 2. Listeria : Bacteriologia I. T. II. Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo, orientador.</p> <p>664.07 CDD</p>
-------	---

Ruth Estela Gravato Rowlands

Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos crus comercializados no município de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
Orientadora/Presidente

1° examinador

2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, de de 2013.

Dedicatória

*Ao meu marido Alexandre, pelo amor, carinho, apoio,
companherismo e paciência.*

*A minha princesinha Isabella que chegou no meio deste
doutorado para encher meu coração de alegria e dar muito mais
sentido a minha vida.*

*Aos meus queridos pais, João e Aparecida, pelo amor, dedicação,
carinho e por sempre me apoiarem.*

*Aos meus irmãos, Rosângela e João Roberto, companheiros para
todos os momentos.*

Aos meus queridos sobrinhos Matheus e João Victor.

Agradecimentos

À Profa. Bernadette D. G. Melo Franco pela oportunidade de realização deste trabalho, pelos ensinamentos, pela amizade e, principalmente, pela confiança.

À Diretoria do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Dra. Deise Aparecida Pinatti Marsiglia, Diretoria do Centro de Alimentos, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Miyoko Jakabi, pela amizade, pelos ensinamentos, por todas as oportunidades, pelo incentivo e pela confiança. Obrigada por acreditar em mim e me apoiar nos momentos mais difíceis. Curte bastante a aposentadoria, mas não se esquece da gente...Vou sentir muito a sua falta!

À Dra. Maria Luisa Barbosa pela amizade, por me socorrer nos momentos mais difíceis, pelos ensinamentos, incentivo e pela valiosa ajuda e apoio que tem me dado. Malu, não poderia deixar de agradecer por você me apresentar a este mundo fascinante que é a biologia molecular...rs...aprendi muito com você e com certeza ainda tenho muito que aprender. Espero continuar contando com a sua ajuda e os seus conhecimentos!

À minha amiga e “comadre” Christiane A. R. Costa. Chris, muito obrigada pela grande parceria neste trabalho, e ao longo destes anos. Obrigada pelo apoio, incentivo, conselhos e pelo ombro amigo sempre que eu preciso!

À minha mais nova “CHEFA”...rs...Cecília G. Martins pela amizade, em primeiro lugar, pela ajuda, apoio, conselhos e por me tranquilizar nos momentos mais difíceis. Como diz a Dani: Força na peruca amiga!!!

À Profa. Dra. Maria Helena Matté pela oportunidade de realização de parte deste trabalho no Laboratório de Práticas de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela colaboração no desenvolvimento deste estudo, pela disponibilidade, orientações, paciência e atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Edson Luiz Durigon pela oportunidade de realização das reações de sequenciamento no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Departamento de Microbiologia do ICB-USP e em especial, à Dra. Angélica Cristine de Almeida Campos e ao Dr. Luciano M. Thomazelli pela valiosa ajuda prestada na execução dos sequenciamentos, pelas orientações, disponibilidade e paciência.

À Dra. Rosemeire Cobo Zanella, pesquisadora do Núcleo de Meningites, Pneumonias e Infecções Pneumocócicas do Instituto Adolfo Lutz pelo treinamento, sugestões e orientações na execução dos testes de microdiluição em placa para avaliação da resistência antimicrobiana.

À Roselaine Silva Barroso que voltou para o Núcleo de Microbiologia trazendo boas lembranças de uma época em que éramos estagiárias e que, além de trabalharmos muito, nos divertíamos muito também! Obrigada Rose pela sua amizade, apoio e pela valiosa ajuda, principalmente, no preparo das inúmeras microplacas para o MIC.

À Daniele Bezerra Faria, sempre solícita e com alto astral, pela amizade, apoio e bons momentos de descontração!!!

À Zenaide de Souza e Maria Imaculada Góes pela amizade, incentivo, apoio e ajuda.

Aos colegas do Núcleo de Microbiologia do IAL Ana Maria, Emerson, Harumi, Alcina, Jucinei, Raquel e Roberto pelo apoio e paciência.

À Dra. Rosemeire Cobo Zanella, pesquisadora do Núcleo de Meningites, Pneumonia e Infecções Pneumocócicas, do Instituto Adolfo Lutz pelo treinamento, sugestões e orientações na execução dos testes de microdiluição em placa para avaliação da resistência antimicrobiana.

À Profa. Dra. Mariza Landgraf, Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martins e Prof. José Paes de Almeida Nogueira Pinto pelas sugestões e correções feitas no exame de qualificação.

À Mônica, Cleonice e Edílson da Secretaria do Departamento, por toda atenção, dedicação e serviços prestados.

À Elaine e Jorge da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção e serviços prestados.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	pag.
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE QUADROS	iv
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.2 Epidemiologia	4
1.3 Patogenicidade e virulência	8
1.4 Resistência antimicrobiana	15
1.5 Genotipagem de <i>L. monocytogenes</i>	17
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Isolados de <i>L. monocytogenes</i>	22
3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana	23
3.3 Pesquisa dos genes de virulência	26
3.3.1 Extração do DNA	28
3.3.2 Amplificação do DNA extraído	29
3.3.3 Detecção dos produtos amplificados	31
3.4 Determinação dos perfis genéticos de isolados <i>L. monocytogenes</i> por PFGE	31
3.5. Avaliação da variabilidade genética pelo sequenciamento parcial do gene <i>actA</i>	33
3.5.1 Purificação da reação de sequenciamento	34
3.5.2 Alinhamento das sequências	34
3.6. Análise filogenética do gene <i>actA</i>	35
3.7 Sequenciamento do gene <i>lmo0737</i> dos isolados identificados como atípicos pela sorotipagem molecular	35
4. RESULTADOS	36
4.1 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana	36
4.2 Pesquisa dos genes de virulência	47
4.3 Sequenciamento parcial do gene <i>actA</i>	50
4.4. Sequenciamento do gene <i>lmo0737</i> dos isolados identificados como atípicos pela sorotipagem molecular	66
4.5. Determinação dos perfis genéticos dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> por PFGE	71
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO	95
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de infecção celular de <i>L. monocytogenes</i> e os fatores de virulência envolvidos em cada etapa.	9
Figura 2 – Estrutura genética da Ilha de patogenicidade 1 (LPL-1) em <i>Listeria</i> sp	13
Figura 3 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus de acordo com o sorogrupo identificado por sorotipagem molecular segundo DOUMITH et al. (2004a).	38
Figura 4 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus de acordo com a origem (produto cárneo) .	40
Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os <i>primers</i> <i>inlA</i> , <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> nos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -14: isolados positivos para os genes <i>inlA</i> , <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> ; 15: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (controle positivo).	47
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os <i>primers</i> <i>plcA</i> , <i>plcB</i> e <i>mpl</i> nos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -13: isolados positivos para os genes <i>plcA</i> , <i>plcB</i> e <i>mpl</i> ; 14: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19112 (controle positivo); 15: H ₂ O (controle negativo).	48

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os *primers iap*, *hly* e *prfA* nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -9: isolados positivos para os genes *iap*, *hly* e *prfA*; 10: *L. monocytogenes* ATCC 19112 (controle positivo); 11: H₂O (controle negativo). 48

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para o *primer actA* em isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100pb). 1 – 7; 9 - 14: isolados com o gene *actA*; 8: controle positivo *L. monocytogenes* ATCC 19112 e 15: controle positivo *L. monocytogenes* ATCC 19114. 49

Figura 09 – Representação do alinhamento de nucleotídeos do fragmento do gene *actA* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (·) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. 53

Figura 10 – Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento do gene *actA* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (·) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. 60

Figura 11- Análise filogenética das sequências do gene *actA* de *L. monocytogenes*, isoladas de salsicha e produtos cárneos crus comercializadas no município de São Paulo, comparadas com sequências depositadas no GenBank. Os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos cárneos, avaliados neste estudo, encontram-se destacados. 65

Figura 12 – Representação do alinhamento de nucleotídeos do fragmento do gene *lmo0737* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (·) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. 67

Figura 13 - Dendograma do perfil genético obtido por eletroforese em campo pulsado (PFGE), utilizando-se a enzima *Apal*, em 166 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salsicha e produtos cárneos crus e nas cepas de referência *L. innocua* IAL 1984, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. seeligeri* IAL 1985, *L. ivanovii* IAL 1983 e *L. welshimeri* IAL 1986. 77

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular.	23
Tabela 2. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular, submetidos à avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana.	24
Tabela 3. Concentrações empregadas para cada antibiótico e critérios estabelecidos pelo CLSI para interpretação dos resultados (pontos de corte).	26
Tabela 4. Sequências de nucleotídeos utilizadas como <i>primers</i> para detecção dos genes de virulência.	28
Tabela 5. Condições de temperatura e tempo empregadas para amplificação dos genes de virulência nos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus.	30
Tabela 6. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular, submetidos à eletroforese em campo pulsado (PFGE).	32
Tabela 7. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos salsicha e produtos cárneos crus.	37
Tabela 8. Distribuição do número e porcentagem de isolados de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com o perfil de susceptibilidade observado em cada sorogrupo.	39

Tabela 9. Distribuição do número e porcentagem de isolados de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com o perfil de susceptibilidade e origem (produto cárneo).	41
Tabela 10. Distribuição do número de isolados de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com os sorogrupos e os diferentes perfis de resistência ou resistência intermediária.	42
Tabela 11. Distribuição do número e porcentagem de isolados de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com o valor do MIC apresentado para os diferentes antibióticos.	44
Tabela 12. Distribuição e porcentagem de isolados de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com o MIC apresentado para Trimetoprim/Sulfametoxazol.	45
Tabela 13 - Valores de MIC50 e MIC90 calculados para os isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus frente aos antibióticos avaliados.	46
Tabela 14. Distribuição e identificação dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus de acordo com a sequência do gene <i>actA</i>	52
Tabela 15 – Distribuição dos diferentes perfis gerados no PFGE de acordo com a origem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> e sorogrupo.	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição das mutações nas diferentes sequências de aminoácidos identificadas para o gene <i>actA</i> nos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus.	Pág. 63
Quadro 2. Identificação e características dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos de salsicha e produtos cárneos crus submetidos à eletroforese em campo pulsado (PFGE).	72

Resumo

Rowlands, R.E.G. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos crus comercializados no município de São Paulo**. 2013. 121 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Listeria monocytogenes é um importante patógeno de origem alimentar que causa listeriose, infecção severa que acomete, principalmente, gestantes, idosos, crianças e imunocomprometidos, e que apresenta elevada taxa de mortalidade. A bactéria está amplamente distribuída no ambiente e é comumente encontrada em produtos cárneos. O presente estudo teve como objetivos caracterizar 439 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha bovina e produtos cárneos crus (carne moída, linguiça suína e coxa de frango) refrigerados, adquiridos no comércio do município de São Paulo, e previamente submetidos à sorotipagem molecular. Os isolados foram caracterizados quanto ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana; presença dos genes de virulência *actA*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *iap*, *hly*, *plcA*, *plcB* e *mpl*; perfil genético por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e sequenciamento parcial dos genes *actA* e *Imo0737*. Baixa frequência de resistência antimicrobiana (0,5%) foi observada entre os 416 isolados avaliados. Um isolado pertencente ao sorogrupo 1 apresentou resistência à penicilina e à clindamicina e outro identificado como 4a ou 4c apresentou resistência à tetraciclina. Todos os isolados foram positivos para os genes de virulência testados. O sequenciamento parcial do gene *actA* mostrou a ocorrência de 14 sequências de nucleotídeos distintas nos 97 isolados avaliados. Além disso, verificou-se a ocorrência de uma deleção de 35 aminoácidos no gene *actA* em 36 isolados, além de substituições de nucleotídeos que resultaram em mutações nas sequências de aminoácidos da grande maioria dos isolados. A análise filogenética do gene *actA* possibilitou o agrupamento dos isolados em duas linhagens distintas (I e II). Os resultados do PFGE indicaram grande variabilidade nos perfis genéticos dos isolados analisados, principalmente

naqueles pertencentes aos grupos 2 (1/2c e 3c), 3 (1/2b e 3b) e 4 (4b, 4d e 4e). Os resultados deste estudo mostram que os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salsicha bovina e produtos cárneos crus comercializados no município de São Paulo, apresentam grande diversidade genética, importante potencial de virulência e baixa frequência de resistência antimicrobiana. A diversidade observada deve-se, provavelmente, à característica ubíqua deste micro-organismo, tornando-o mais susceptível a grande pressão seletiva do ambiente.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Produtos cárneos. Resistência antimicrobiana. Virulência. Tipagem molecular.

Abstract

Rowlands, R.E.G. **Genotypic and Phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from refrigerated meat products marketed in the city of São Paulo.** 2013. 121 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen that causes listeriosis, a severe infection that affects primarily pregnant women, elderly, children and immunocompromised individuals, and has a high mortality rate. The bacteria is widely distributed in the environment and commonly found in meat products. The present study aimed to characterize 439 isolates of *L. monocytogenes* obtained from pork sausage and raw chilled meat products (ground beef, beef sausage, and chicken thigh) purchased in supermarkets in the city of São Paulo, and previously submitted to molecular serotyping. The isolates were characterized for antimicrobial susceptibility profile; presence of virulence genes *actA*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *iap*, *hly*, *plcA*, *plcB* and *mpl*; genetic profile by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and partial sequencing of genes *actA* and *lmo0737*. A low frequency of antimicrobial resistance (0.5%) was observed among the 416 evaluated isolates. One isolate belonging to serogroup 1 presented resistance to clindamycin and penicillin and another one identified as 4a or 4c was resistant to tetracycline. All isolates were positive for the tested virulence genes. The partial sequencing of the gene *actA* indicated the occurrence of 14 distinct nucleotide sequences in the 97 isolates tested. Furthermore, a deletion of 35 amino acids in the *actA* gene was detected in 36 isolates, and nucleotide substitutions that resulted in amino acid changes in the sequences of most isolates. Phylogenetic analysis of the *actA* gene clustered the isolates in two distinct lineages (I and II). Results of PFGE indicated a great genetic variability among isolates, especially among those belonging to groups 2 (1/2c and

3c), 3 (1/2b and 3b) and 4 (4b, 4d and 4e). The results of this study show that isolates of *L. monocytogenes* from pork sausage and raw meat products marketed in the city of São Paulo present a great genetic diversity, significant virulence potential and low frequency of antimicrobial resistance. The detected diversity is probably due the ubiquitous nature of these microorganisms, making them more susceptible to selective pressure of the environment.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Meat products. Antimicrobial resistance. Virulence. Molecular typing.

1. INTRODUÇÃO

As Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA) são comuns e representam uma séria ameaça à saúde humana. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, aproximadamente dois milhões de pessoas vão a óbito devido a doenças diarreicas, enquanto centenas de milhões sofrem de episódios frequentes de diarreia e suas consequências debilitantes, com a grande maioria sendo causada por micro-organismos veiculados por alimentos e água (WHO, 2007).

Nos EUA estima-se que ocorram, anualmente, 48 milhões de novos casos de enfermidades transmitidas por alimentos, 128 mil hospitalizações e três mil mortes (SCALLAN et al., 2011a; SCALLAN et al., 2011b).

No Brasil, no período de 2000 a 2011, foram notificados 8.663 surtos de ETA, com maior ocorrência nas regiões sul (42,1 %) e sudeste (37,3 %). O agente etiológico foi identificado em 45,3 % dos surtos e entre os alimentos envolvidos nos surtos destacam-se os produtos de origem animal, principalmente, as carnes de frango, bovina e suína, in natura ou processadas (BRASIL, 2011).

Além do prejuízo social, a contaminação de alimentos com micro-organismos patogênicos gera um enorme prejuízo econômico. O custo anual com doenças associadas a quatorze patógenos de origem alimentar, nos EUA, é estimado em 14 bilhões de dólares, sendo que 90% desse valor referem-se a cinco patógenos: *Salmonella enterica* não tifóide (3,3 bilhões), *Toxoplasma gondii* (3 bilhões), *Listeria monocytogenes* (2,6 bilhões), norovírus (2 bilhões) e *Campylobacter* spp. (1,7 bilhões) (HOFFMAN; BATZ; MORRIS, 2012).

Nos últimos anos, *Listeria monocytogenes* tem se destacado como um importante patógeno de origem alimentar, sendo foco de muitas pesquisas e do sistema de vigilância dos órgãos governamentais e de indústrias alimentícias. *L. monocytogenes* pode causar a listeriose, uma doença relativamente rara, mas que apresenta elevada taxa de mortalidade (HUANG et al., 2011; WEBER et al., 2012; EFSA, 2012), colocando este micro-organismo como um dos principais patógenos responsável por mortes associadas com ETA (SCALLAN et al., 2011a).

Diversos fatores têm contribuído para o aumento da importância de *L. monocytogenes* como um problema de saúde pública tais como: mudanças nos processos de produção, processamento e distribuição dos alimentos; utilização da

refrigeração como principal forma de conservação dos alimentos; mudanças nos hábitos alimentares da população que passou a consumir com mais frequência alimentos prontos para o consumo e aumento no número de indivíduos com maior risco para adquirir listeriose, principalmente os idosos, imunocomprometidos, gestantes e neonatos (LUNGU et al., 2011).

Assim, considerando a importância de *L. monocytogenes* para a saúde pública, sua elevada prevalência em produtos cárneos (ARAGON-ALLEGRO et al, 2008; MIYASAKI et al, 2009; RISTORI , 2010) e a necessidade de mais informações sobre as características fenotípicas e genotípicas deste patógeno no Brasil, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de virulência; a resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de produtos cárneos comercializados no município de São Paulo. Os dados gerados contribuíram para ampliar o conhecimento sobre as características de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, importante em um processo de Avaliação de Risco Microbiológico.

1.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído por nove espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. *L. monocytogenes* é considerada a principal espécie patogênica ao homem e animais (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). Recentemente, três novas espécies foram descritas: *L. weihenstephanensis* (LANG HALTER; NEUHAUS; SCHERER, 2012), *L. marthii* (GRAVES et al., 2010) e *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2010).

De acordo com as proteínas de superfície que apresenta (antígenos somáticos e flagelares), *L. monocytogenes* pode ser classificada em 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007), entretanto apenas três (1/2a, 1/2b, e 4b) são responsáveis pela maioria dos casos de listeriose (CLARK et al., 2010; HUANG et al., 2011; PONTELLO et al., 2012). Destes, o sorotipo 4b é o mais comumente envolvido em surtos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Os demais raramente estão envolvidos em infecções em humanos, embora sejam comumente isolados de animais, alimentos e do ambiente (DOUMITH et al., 2004a).

As cepas de *L. monocytogenes* podem ser agrupadas em quatro linhagens filogenéticas, diferenciadas por PFGE, arranjos de DNA, ribotipagem, polimorfismos em genes de virulência e MLEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*) (WIEDMANN et al., 1997; BROSCHE; CHEN; LUCHANSKY, 1994; GRAVES et al., 1994; DOUMITH et al., 2004b; WARD et al., 2008). A linhagem I é constituída pelos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e; a linhagem II pelos sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e a linhagem III pelos sorotipos 4a, 4c e alguns isolados 4b considerados atípicos por apresentarem características moleculares distintas do sorotipo 4b pertencente a linhagem I (WIEDMANN et al., 1997; WARD et al., 2004; LIU et al., 2006; RAGON et al., 2008). Os isolados da linhagem III podem ser classificados em três subgrupos denominados IIIA, IIIB e IIIC (ROBERTS et al., 2006). Estudos recentes sugerem, ainda, que os isolados previamente caracterizados como linhagem IIIB devem ser classificados em uma nova linhagem denominada linhagem IV, uma vez que são filogeneticamente distintos das demais linhagens (WARD et al., 2008). A linhagem IV raramente é encontrada (ORSI; DEN BAKKER; WIEDMANN, 2011).

1.2 Epidemiologia

L. monocytogenes está amplamente distribuída no ambiente, podendo ser isolada de diferentes fontes como solo, água, vegetação, lodo e esgoto (CEBALLOS et al., 2003; SAHLSTRÖM et al., 2004; PAILLARD et al., 2005; LYAUTEY et al., 2007; KEROUANTON et al., 2010; FOX; LEONARD; JORDAN, 2011; SAUDERS et al., 2012). Os bovinos, ovinos, caprinos, aves, suínos e animais silvestres também são reservatórios importantes deste patógeno (RAMASWAMY et al., 2007; HELLSTRÖM et al., 2010; SCHODER et al., 2011).

Devido à característica ubíqua de *L. monocytogenes*, os produtos alimentícios podem ser facilmente contaminados com esta bactéria. Estudos relatam sua ocorrência em uma grande variedade de alimentos, como leite e derivados, carne bovina, suína, aves, pescados, embutidos e vegetais (BRITO et al, 2008; BARANCELLI et al., 2011; MARTINS; GERMANO, 2011; SANT'ANA et al., 2012; KORSACK et al., 2012; WIECZOREC; DMOWSKA; OSEK, 2012a).

Dentre os alimentos, os produtos cárneos crus e processados representam uma importante fonte de *L. monocytogenes* (BARROS et al., 2007; CHIARINI et al., 2009; MIYASAKI et al, 2009; MARTINS; GERMANO, 2011; NALÉRIO et al., 2009; KORSACK et al., 2012; WIECZOREC; DMOWSKA; OSEK, 2012a). Em estudo realizado por RISTORI (2010), em 552 amostras de produtos cárneos comercializados no município de São Paulo, *L. monocytogenes* foi detectada em em amostras de carne bovina moída (59,4 %), coxa de frango (58%), linguiça suína (39,8%) e salsicha bovina (37,7 %) .

A presença do patógeno no trato intestinal dos animais pode favorecer a contaminação de carcaças e do ambiente durante o processo de abate (ZHU et al., 2012). Posteriormente, matérias-primas oriundas de abatedouros/frigoríficos, contendo o micro-organismo, podem contribuir para disseminação de *L. monocytogenes* durante o processamento de produtos cárneos na indústria. A aplicação de práticas de fabricação e higiene inadequadas favorece a formação de focos de multiplicação microbiana de difícil remoção (biofilmes). Os biofilmes, aliados a capacidade de sobrevivência em temperatura de refrigeração, altas concentrações de sal, atmosfera com baixa tensão de oxigênio e pH ácido contribuem para a persistência de *L. monocytogenes* nas instalações e equipamentos, tornando o seu controle um grande desafio para a indústria de alimentos (THÉVENOT;

DERNBURG; VERNOSY-ROZAND, 2006; BARROS et al., 2007; CAPENTIER; CERF, 2011).

A evidência de transmissão de *L. monocytogenes* por alimentos ocorreu no início da década de 80, após o relato de um surto de listeriose no Canadá associado ao consumo de salada de repolho (SCHLECH et al., 1983). Desde então, inúmeros surtos envolvendo, principalmente, os produtos prontos para o consumo, têm sido descritos mundialmente (OLSEN et al., 2005; MEAD et al., 2006; WINTER et al., 2009; KOCH et al., 2010; CDC, 2011; HUANG et al., 2011; JACKSON et al., 2011; GAULIN; RAMSAY; BEKAL, 2012; CARTWRIGHT et al., 2013).

Nos EUA, estima-se que *L. monocytogenes* seja responsável por 1.600 casos de listeriose, com 1.400 hospitalizações e 250 mortes, anualmente (SCALLAN, 2011a). No período de 2009 a 2011, foram reportados, aos sistemas de vigilância dos EUA, 1.651 casos de listeriose com taxa de incidência anual de 0,29 casos por 100.000 habitantes. Os indivíduos mais afetados foram os idosos com mais de 65 anos de idade (58%) e as mulheres grávidas (14%) (CDC, 2013b). Na Europa, um aumento significativo no número de casos tem sido observado nos últimos anos, principalmente entre os idosos (DENNY; MCLAUCHLIN, 2008; MUNÓZ et al., 2012). Em 2010 foram confirmados 1.602 casos de listeriose, com 17% de taxa de mortalidade (EFSA, 2012).

No Brasil, poucos casos de listeriose são conhecidos (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998; HOFER; MELLES; HOFER, 1999; LANDGRAF et al., 1999; HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000; SCHWAB; EDELWEISS, 2003; HOFER; REIS; HOFER, 2006; TOYOSHIMA et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2008) e mesmo nestes a fonte de infecção não foi identificada. MARTINS et al. (2010) relataram seis casos de listeriose em pacientes idosos que adquiriram a infecção em um hospital do Rio de Janeiro. Embora a fonte de infecção não tenha sido confirmada, é provável que a via de transmissão tenha sido a alimentação fornecida pelo hospital.

A listeriose é observada com mais frequência em países industrializados devido, provavelmente, ao estilo de vida da população, que consome com mais frequência alimentos processados prontos para o consumo (NORTON; BRADEN, 2007). A maior ocorrência nos países desenvolvidos também pode estar associada ao fato dos sistemas de notificação de surtos serem mais organizados e eficientes. Ainda assim, os casos notificados são certamente inferiores aos que de fato

ocorrem. Os sinais clínicos semelhantes a uma gripe, acompanhados ou não de manifestações gastrointestinais, contribuem para uma conclusão diagnóstica inespecífica e/ou auto-medicação, mascarando a ocorrência verdadeira dos casos. Além disso, o longo período de incubação da listeriose, que varia de semanas a meses, pode prejudicar a investigação epidemiológica e, conseqüentemente, a identificação do alimento responsável pela infecção (GOULET et al., 2013).

A listeriose em humanos representa uma das infecções mais severas de origem alimentar. Acomete, principalmente, mulheres grávidas, neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos como portadores de HIV, diabetes, doenças do fígado, câncer e transplantados (PAINTER; SLUTSKER, 2007; POUILLOT et al, 2012). Esse grupo de indivíduos apresenta, geralmente, alterações no sistema imunológico que levam a deficiência de células e moléculas que desempenham papel fundamental na defesa do organismo contra listeriose, como: redução na quantidade de citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas; diminuição do número de monócitos no sítio de infecção; diminuição na quantidade de células T (CD8+ e CD4+) e mudanças na população de células T *helper* (PAMER, 2004; ORGUN et al., 2008; POULSEN; CZUPRYNSKI, 2013; SHERRID; KOLLMANN, 2013).

A listeriose é caracterizada por três síndromes: gastroenterite febril; listeriose materno-fetal/neonatal ou bacteremia com ou sem infecções do sistema nervoso (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Infecções focais menos comuns, como endocardite, peritonite e artrite séptica, bem como eczantemas de pele (listeriose cutânea) também têm sido descritas (DOGANAY, 2003; TOYOSHIMA et al., 2006; BIERHOFF et al., 2011; DIAS et al., 2011).

A gastroenterite acomete, geralmente, indivíduos saudáveis, sendo caracterizada por um período de incubação de 6-49 h (média de 24 h) e sintomas inespecíficos como diarreia, febre, dor abdominal, dor de cabeça e mialgias. É uma doença autolimitante e a maioria dos pacientes se recupera sem a necessidade de tratamento com antibióticos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007)

Em gestantes, a listeriose ocorre com mais frequência no último trimestre de gestação. Os sintomas são, geralmente, semelhantes a uma gripe e incluem febre, mialgias e dor de cabeça. Complicações como aborto, natimorto, nascimento prematuro ou infecção neonatal podem ocorrer. Aproximadamente dois terços dos recém-nascidos de mães com listeriose apresentam a infecção neonatal. Existem

duas formas de listeriose em recém-nascidos: a precoce e tardia. A precoce ocorre logo após o nascimento e se deve a infecção intra-uterina por transmissão via placenta ou inalação/ingestão de líquido amniótico contendo o patógeno. Os sintomas mais comuns são problemas respiratórios agudos, pneumonia, bacteremia e granulomatose infatiseptica. Os sorotipos 1a e 1b são os mais frequentes na listeriose neonatal precoce. A tardia ocorre, em média, após 15 dias do nascimento e está frequentemente associada à meningite. A transmissão ocorre, provavelmente, durante o parto (canal vaginal) ou de forma nosocomial, sendo o sorotipo 4b o mais comum nesta forma de listeriose. *L. monocytogenes* encontra-se entre as três principais causas de meningite em recém-nascidos, apresentando uma taxa de mortalidade que pode variar de 3 a 50% (DREVETS; BRONZE, 2008; POSFAY-BARBE; WALD, 2009; LAMONT et al., 2011).

Na listeriose invasiva, não neonatal, a doença se apresenta como uma bacteremia com ou sem focos de infecção evidentes (DREVETS; BRONZE, 2008) ou afeta o sistema nervoso central podendo causar meningite, meningoencefalite, romboencefalite e abscessos no cérebro (DISSON; LECUIT, 2012). A maioria dos casos é observada em pacientes com mais de 50 anos, sendo febre, percepção sensorial alterada e dor de cabeça, os sintomas mais evidentes (BROUWER et al., 2006).

A dose infectante de *L. monocytogenes* é desconhecida e as informações existentes se baseiam em dados epidemiológicos de surtos (FAO/WHO, 2004; KOCH et al., 2010) e experimentos realizados com animais (WILLIAMS et al., 2007; SMITH et al., 2008) que sugerem doses infectantes altas, de 10^4 a 10^7 UFC. No entanto, estudos realizados com modelos animais apresentam limitações e os dados obtidos devem ser avaliados com cautela. Dentre as dificuldades destacam-se a existência de interações espécie-específicas entre as internalinas A e B e as células do hospedeiro; diferenças de susceptibilidade e manifestações clínicas dentro de uma mesma espécie animal; diferenças de patogenicidade entre cepas de *L. monocytogenes* e idade e condição fisiológica do grupo estudado (HOELZER; POUILLLOT; DENNIS, 2012).

1.3 Patogenicidade e virulência

L. monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo capaz de invadir, sobreviver e se multiplicar em macrófagos e outras células não fagocitárias como células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos, células endoteliais e do sistema nervoso (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; HAMON, BIERNE; COSSART, 2006).

Após a ingestão do alimento contaminado, *L. monocytogenes* atravessa o trato gastrointestinal, sobrevivendo aos seus mecanismos de defesa (SLEATOR; GAHAN; HILL, 2003), e no lúmen intestinal invade as células epiteliais, colonizando os tecidos mais profundos. Posteriormente, a bactéria se dissemina pela corrente sanguínea e linfonodos mesentéricos, chegando ao fígado e baço, onde se multiplica, preferencialmente em macrófagos ou em células epiteliais (LECUIT, 2007). O micro-organismo pode escapar do sistema imune do hospedeiro, continuar se multiplicando, atingir a corrente sanguínea novamente e infectar o cérebro ou a placenta, causando uma infecção sistêmica fatal (STAVRU; ARCHMBAUD; COSSART, 2011).

Ao longo de sua evolução, este micro-organismo tem adquirido diversos fatores de virulência responsáveis por sua sobrevivência em condições externas adversas e por sua adaptação como um patógeno intracelular (LIU et al., 2007a). O ciclo de infecção de *L. monocytogenes* em macrófagos e células não fagocitárias é constituído pelas seguintes etapas: adesão, internalização, escape de vacúolos primários, multiplicação intracelular, motilidade intracelular, disseminação célula-célula e escape de vacúolos secundários. Cada uma dessas etapas é mediana por diferentes proteínas produzidas por *L. monocytogenes* (Figura 1).

Figura 1 – Representação esquemática do ciclo de infecção celular de *L. monocytogenes* e os fatores de virulência envolvidos em cada etapa. Fonte: CAMEJO et al., 2011.

A adesão às células epiteliais do trato gastrointestinal do hospedeiro é a primeira etapa do ciclo e é mediada por inúmeras proteínas como:

- Lap, presente em todas as espécies de *Listeria*, com exceção de *L. grayi* (JAGADEESAN et al., 2010);
- Ami, associada à adesão às células epiteliais (MILOHANIC et al., 2004);
- dltA, que faz parte do operon (*dltA*, *dltB*, *dltC* e *dltD*) e está envolvida na adesão em macrófagos e células epiteliais (ABACHIN et al., 2002);
- FbpA, que, além de atuar como uma proteína de ligação a fibronectina, estabiliza e assegura a secreção das proteínas LLO e InlB, importantes no processo de invasão (DRAMSI et al., 2004);

- InlJ, presente somente no genoma de *L. monocytogenes*, atuando indiretamente no processo de adesão e expressa, especialmente, *in vivo* (SABET et al., 2005; SABET et al., 2008);
- CtaP, proteína associada ao transporte de cisteína, resistência a acidez, integridade da membrana bacteriana e adesão às células do hospedeiro (XAYARAT et al., 2009);
- LapB, ausente em *Listeria* não patogênicas (REIS et al., 2010);
- ActA, associada a motilidade intracelular do micro-organismo, mas participa do processo de adesão (ALVAREZ-DOMÍNGUEZ; ROBERTS; STAHL, 1997);
- RecA, contribui para colonização das células do trato gastrointestinal e translocação do patógeno para o epitélio intestinal (VAN DER VEEN; ABEE, 2011);
- inlF, proteína específica de *L. monocytogenes* que apresenta papel na virulência somente sob determinadas condições e em hospedeiros específicos (KIRCHNER; HIGGINS, 2008).

A entrada de *L. monocytogenes* nos macrófagos é conduzida pela própria célula fagocitária. Em células não fagocitárias, a internalização do patógeno é mediada pela interação entre proteínas presentes na superfície da célula bacteriana e receptores das células do hospedeiro. Entre essas proteínas, destacam-se as internalinas A e B (InlA e InlB), caracterizadas por apresentar em sua estrutura repetições ricas em leucina (LRR), responsáveis por intermediar a ligação com a célula do hospedeiro (LECUIT, 2005). A InlA é uma proteína de 85 kDa, codificada pelo gene *inlA*, que se liga à E-caderina, uma glicoproteína transmembrana de adesão, presente na célula do hospedeiro, resultando no rearranjo do citoesqueleto e entrada da bactéria na célula (SCHUBERT et al., 2002). A InlB é uma proteína de 65 kDa, codificada pelo gene *inlB*, que interage com a proteína Met, um receptor tirosina quinase e receptor natural de fator de crescimento de hepatócitos (SHEN et al, 2000). Met é expressa de forma ubíqua o que favorece a internalização de *L. monocytogenes*, mediada por InlB, por diversas células incluindo hepatócitos, fibroblastos e células epiteliais e endoteliais (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001), enquanto a E-caderina é expressa por um número muito limitado de células epiteliais, restringindo o tropismo celular de InlA (BONAZZI; LECUIT; COSSART, 2009).

Após a internalização e permanência temporária em vacúolos primários, o patógeno sai do vacúolo, movendo-se para o citoplasma. Este escape é mediado por três moléculas: a listeriolisina O (LLO), fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC) e fosfatidilcolina-fosfolipase C (PC-PLC). LLO é uma proteína de 58-60 kDa, constituída por 529 aminoácidos, pertencente à família das toxinas ativadas por tiol, colesterol-citosina dependente (CDTX) e um dos principais fatores de virulência em *L. monocytogenes*. LLO é codificada pelo gene *hly*, o primeiro gene de virulência descrito em *Listeria*. Esta proteína é responsável pela atividade hemolítica de isolados virulentos e, também pela formação de poros na membrana do vacúolo, causando sua lise durante o processo de invasão (SCHNUPF; PORTNOY, 2007; GILBERT et al., 2010). A proteína PI-PLC é codificada pelo gene *plcA* e atua em sinergismo com a proteína PC-PLC, codificada pelo gene *plcB*, auxiliando a proteína LLO na ruptura dos vacúolos primários. PC-PLC é expressa como uma pró-enzima e sua ativação ocorre somente no ambiente ácido do vacúolo por uma metaloprotease (Mpl), codificada pelo gene *mpl*, que contribui indiretamente para patogenicidade e invasão celular.

Uma vez no citoplasma a bactéria se multiplica rapidamente. Entre os fatores necessários para uma proliferação intracelular eficiente destacam-se a proteína Hpt (homólogo da translocase glicose-6-fosfato de mamíferos) (CHICO-CALERO et al., 2002) e a lipoato lipase LplA1 (KEENEY; STUCKEY; O'RIORDAN, 2007). A migração intracelular e disseminação célula-célula do micro-organismo é mediada pela proteína ActA, que induz a polimerização de filamentos de actina da célula do hospedeiro, levando a formação de uma “cauda” em um dos polos da bactéria, que permite a sua propulsão e movimentação no citoplasma (SMITH; PORTNOY, 1997). Outra proteína envolvida na disseminação célula-célula é a internalina C (InlC) que provoca desarranjos nas junções celulares (RAJABIAN et al., 2009).

Uma característica interessante da proteína ActA, constituída por 639 aminoácidos, é a presença de uma região contendo quatro repetições de uma sequência rica em prolina (*proline-rich repeat* - PRR). Algumas isolados de *L. monocytogenes* podem apresentar uma deleção de 105 pb nessa região, equivalente a 35 aminoácidos, removendo duas cópias destas PRR. Essa deleção pode comprometer a virulência do patógeno, uma vez que essa região desempenha um papel importante na motilidade de *L. monocytogenes* (SMITH et al., 1996; GEESE et al., 2002). A alteração da proteína ActA pode ser um dos principais

fatores associados à virulência atenuada em cepas do sorotipo 4a (CHAKRABORTY et al., 1994; LIU et al., 2007a). A deleção tem sido observada também em outros sorotipos, ocorrendo com mais frequência nos sorotipos 1/2b (77%) e 4b (51%) do que nos sorotipos 1/2a (7,5%) (HAIN et al., 2012). Entretanto, não há um consenso sobre o impacto dessa alteração na virulência de *L. monocytogenes* (FRANCIOSA et al., 2005; CHEN et al., 2009; CONTER et al., 2010).

Durante a migração para a membrana citoplasmática, a bactéria é envelopada em estruturas semelhantes à filopódes, que são englobadas pela célula vizinha, levando a formação de vacúolos secundários, compostos por uma membrana de dupla camada. A lise dos vacúolos secundários é mediada pela PC-PLC, iniciando um novo ciclo de infecção (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Outra proteína envolvida na adesão e invasão celular é a p60, a maior proteína extracelular de *L. monocytogenes*, codificada pelo gene *iap* (*invasion-associated protein*). Esta proteína é encontrada em todas as espécies de *Listeria* e possui um papel importante no metabolismo desses micro-organismos, sendo responsável pela hidrólise de mureína durante o processo de divisão celular bacteriana. Mutantes de *L. monocytogenes* com deleções no gene *iap* podem não apresentar motilidade intracelular, devido a um defeito na distribuição da proteína ActA durante o processo de divisão celular incorreto (PILGRIM et al., 2003). A p60 contribui na colonização de células, sendo considerada um fator de virulência acessório (KUHN; GOEBEL, 2007).

Os genes *plcA*, *plcB*, *hly*, *mpl* e *actA* estão situados em uma região do cromossomo de 9 kb conhecida como “Ilha de patogenicidade de *Listeria* 1 (LPI-1) ou “agrupamento de genes de virulência” (virulence gene cluster, vgc), regulados por um regulador pleiotrófico de virulência denominado PrfA (proteína codificada pelo gene *prfA*) (Figura 2) (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). PrfA pertence à família de ativadores transcricionais Crp/Fnr e apresenta atividade máxima a 37°C (IVY et al., 2010). Esta proteína também está presente em *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, porém com atividade diferente da proteína PrfA presente em *L. monocytogenes* (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A presença de mutações múltiplas no gene *prfA* pode estar associada a baixa atividade desta proteína em *L. seeligeri* (MAUDER et al., 2006).

Figura 2 – Estrutura genética da Ilha de patogenicidade 1 (LPL-1) em *Listeria* sp. Fonte: VAZQUEZ-BOLAND et al, 2001.

Além da imunidade do hospedeiro e do número de micro-organismos ingeridos, o potencial de virulência de *L. monocytogenes* é um fator determinante para desenvolvimento da doença (NEVES et al., 2008). Em princípio, qualquer isolado de *L. monocytogenes* deve ser considerado potencialmente patogênico para os humanos, mas o grau de virulência pode variar (ROCHE et al., 2009). Enquanto alguns isolados são naturalmente virulentos e capazes de causar doenças severas, outros são avirulentas e incapazes de se estabelecer no hospedeiro (LIU et al., 2007). O estudo dos sorotipos e subtipos moleculares de cepas responsáveis por grandes surtos epidêmicos de listeriose tem sido um ponto de partida para mostrar a variabilidade de virulência deste microrganismo, uma vez que um número muito pequeno de sorotipos e clones tem sido implicado (JEFFERS et al, 2001; CHEN; ZHANG; KNABEL, 2005). Alguns estudos relatam que isolados obtidos de alimentos ou indústrias alimentícias são fracamente patogênicos ou não são patogênicos em testes realizados *in vivo* (HODŽIĆ et al., 2011) ou *in vitro* (ROCHE et al., 2009). Métodos laboratoriais adequados para avaliação do potencial patogênico de *L. monocytogenes* são de fundamental importância, uma vez que podem contribuir para uma melhor compreensão da virulência e patogenicidade deste patógeno, assim como para prevenção e controle da listeriose (LIU, 2006). Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para determinar a virulência de *L. monocytogenes*, sendo a pesquisa de genes de virulência e a produção e expressão de fatores de virulência e

outras proteínas em ensaios com camundongos e culturas celulares, os mais comumente utilizados (JARADAT; SCHUTZE; BHUNIA, 2002). Atualmente, outros modelos de hospedeiro, como as larvas do inseto *Galleria mellonella*, estão sendo utilizados para estudar a patogênese de *Listeria* (SCHRAMA et al., 2013).

A identificação e caracterização de cepas virulentas e avirulentas é complexa, uma vez que múltiplos fatores estão envolvidos no processo, sendo necessária, geralmente, a combinação de dois ou mais métodos para determinar a virulência de uma cepa (ROBERTS et al., 2005).

Estudos realizados em diversos países mostram a ampla distribuição dos genes de virulência descritos em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos, amostras clínicas e do ambiente (RAWOOL et al., 2007; CHEN et al., 2009; CONTER et al., 2010; HODZIC et al., 2011; WIECZOREC; DMOWSKA; OSEK, 2012).

No Brasil ainda são poucos os estudos focados nos fatores de virulência de *L. monocytogenes*. BUENO et al. (2010) relataram a ocorrência dos genes *prfA*, *hlyA* e *inlA* em todos os 63 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de diferentes fontes. Os autores verificaram que os isolados clínicos apresentaram uma maior invasão de Caco-2 e expressão do gene *InlA* do que os isolados obtidos de alimentos. Por outro lado, CRUZ (2007) observou que a quantidade de transcritos de *InlA* em isolados de origem não clínica foi maior do que em isolados clínicos. A análise molecular do gene *iap*, realizada por MELLO et al. (2008), mostrou que os isolados obtidos de produtos lácteos apresentaram variações genéticas, incluindo substituições, inserções e deleções quando comparados à cepa padrão EGD-e. A pesquisa dos genes *hly*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcA* e *prfA* em isolados de *L. monocytogenes* sorotipo 4b provenientes de casos de listeriose humana (26) e de produtos cárneos (46), realizada por BARBOSA et al. (2012), mostrou que apenas um isolado de origem humana e dois isolados obtidos de alimentos foram negativos para os genes *prfA* e *inlA*, respectivamente. Em 69 isolados obtidos de vegetais minimamente processados, SANT'ANA et al. (2012), detectaram o gene *inlA* em 100% das amostras e os genes *inlC* e *InlJ* em 97% deles. NALÉRIO (2009) observou que 85,7% dos 99 isolados obtidos de alimentos, ambiente, equipamentos e amostras clínicas apresentaram os genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlI*, *inlG*, *inlH*, *inlE*, *inlJ*, *uhpT*, *prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly* e *actA*.

1.4 Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um tema de grande relevância à saúde pública. A importância do assunto tem gerado intensas discussões em agências internacionais como Organização Mundial da Saúde, Organização Internacional de Epizootias e *Codex Alimentarius*, que têm incentivado a aplicação de estratégias alternativas ao uso de antibióticos, bem como monitoramento da resistência antimicrobiana na medicina humana, animal e na produção de alimentos (WHO et al., 2012).

A emergência de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos tem sido atribuída ao uso abusivo de drogas antimicrobianas e à aplicação de medidas inadequadas para controle da disseminação das infecções. O uso de antibióticos fora do campo da medicina humana é elevado, sendo provavelmente sua utilização como promotores de crescimento e agentes profiláticos na produção de alimentos de origem animal uma das principais causas para o surgimento de micro-organismos com resistência aos antimicrobianos (WHO, 2012). Uma das consequências indesejáveis é a possibilidade de transmissão de bactérias patogênicas resistentes ao homem pela ingestão de alimentos contaminados, podendo causar infecções de difícil tratamento (EFSA, 2008; LOZANO; ARIAS, 2008).

Embora não haja consenso sobre o real impacto do uso de agentes antimicrobianos na produção animal, alguns países têm adotado novas regulamentações e abordagens quanto ao seu uso para reduzir a emergência de cepas resistentes (SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006). Nos países com esforços sustentados nessa área, a resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas e indicadoras, isoladas de produtos cárneos locais, tem sido inferior à observada em produtos importados, demonstrado que as medidas recomendadas podem ter um impacto mensurável (WHO, 2012).

A emergência da resistência aos antimicrobianos, principalmente às drogas de importância clínica, tem inúmeras consequências para a saúde humana, tais como: falhas no tratamento, limitação da escolha terapêutica, necessidade de uso de drogas mais caras, aumento nos índices de hospitalização, aumento nas taxas de mortalidade e aumento na ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (MOLBAK, 2005). Além disso, com a crescente globalização da produção e comercialização de produtos alimentícios, a ocorrência de resistência antimicrobiana

pode gerar imensos prejuízos econômicos para o país devido às barreiras sanitárias impostas durante a exportação de produtos (WHO, 2012).

O tratamento da listeriose com antibióticos é indicado nos casos de doença invasiva, principalmente nos grupos de risco, utilizando-se antibióticos β -lactâmicos (penicilina ou ampicilina) associados ou não com aminoglicosídeos (gentamicina). Em pacientes alérgicos a penicilina pode ser administrada a vancomicina/teicoplanina ou o trimetoprim/sulfametoxazol (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Outras drogas antimicrobianas como eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, linezolida e rifampicina também podem ser empregadas no tratamento de listeriose (CHARPENTIER; GERBAUD; COURVALIN, 1999; SALAMANO et al., 2005; MOROSI; FRANCISCI; BALDELLI, 2006).

L. monocytogenes é, geralmente, susceptível a maioria dos antibióticos. Alguns estudos mostram uma baixa frequência de resistência em isolados de origem humana (VITAS et al., 2007; MORVAN et al., 2010; OKADA et al., 2011) e não humana (O'CONNOR et al., 2010; GRANIER et al., 2011; KORSACK et al., 2012; ADZITEY, HUDA; ALI, 2012). Entretanto, há relatos de aumento nas taxas de resistência antimicrobiana, principalmente, em isolados obtidos de produtos de origem animal e ambiente (CONTER et al., 2009; DAVIS; JACKSON, 2009; PESAVENTO et al., 2010; RUIZ-BOLIVAR et al., 2011; LUNGU et al., 2011).

No Brasil, há poucos estudos avaliando o perfil de resistência antimicrobiana em isolados de *L. monocytogenes*, sendo a maioria realizada com um número reduzido de isolados. REIS et al. (2011) verificaram que apenas um entre 68 isolados de origem humana apresentou resistência a rifamicina e duas ao trimetoprim-sulfametoxazol. LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO (2007) observaram que duas cepas entre treze isoladas de casos clínicos apresentaram resistência ao sulfametoxazol. Quanto aos isolados de origem não humana, resistência antimicrobiana não foi observada em isolados provenientes de abatedouros de bovinos (SILVEIRA, 2010), suínos (FERRONATO, 2010) e produtos lácteos (NES, 2008). Por outro lado, em estudo conduzido por CHIARINI (2007) com 210 isolados provenientes de abatedouros de frango, foi observada resistência para clindamicina (60,5%), eritromicina (2,4%) e cloranfenicol (2,4%).

A maioria dos micro-organismos resistentes aos agentes antimicrobianos surgiu devido a mutações genéticas espontâneas, seguidas de uma grande pressão seletiva do ambiente (FDA, 2005). No entanto, a resistência pode ser decorrente da

aquisição de material genético por transferência horizontal ou vertical, representando um fator predominante associado com a emergência, evolução e disseminação desses marcadores genéticos (MIRIAGOU; CARATTOLI; FANNING, 2006).

A heterogenicidade genética existente em *Listeria* spp. indica que a transferência vertical e horizontal de material genético são eventos relativamente comuns nessa bactéria, sendo os *Enterococcus* spp. e *Streptococcus* spp. as fontes mais frequentes de genes de resistência (BIAVASCO et al., 1996; ROBERTS et al., 1996). No entanto, o material genético pode ser proveniente de outros micro-organismos Gram positivos, como *Staphylococcus aureus*, que possam estar presentes no trato gastrointestinal de animais e nas plantas de processamento de alimentos (CHARPENTIER; GERBAUD; COURVALIN, 1999; NAVRATILOVA et al., 2004).

Considerando a alta taxa de mortalidade associada a este patógeno, a emergência e disseminação de resistência antimicrobiana em *L. monocytogenes* podem ter implicações clínicas significantes para o tratamento da listeriose (CONTER et al., 2009). Pouco se sabe sobre a resistência antimicrobiana em *L. monocytogenes*, especialmente em isolados de origem não humana. A ampla distribuição de sorotipos com relevância epidemiológica e os relatos de ocorrência de cepas resistentes às drogas antimicrobianas indicam um potencial risco a saúde pública, sendo necessário o monitoramento dos perfis de resistência do patógeno bem como do padrão de disseminação da resistência ao longo da cadeia produtiva de alimentos.

1.5 Genotipagem de *L. monocytogenes*

A listeriose afeta, normalmente, indivíduos particularmente susceptíveis, o que contribui para a ocorrência de infecções, frequentemente, dispersas, apesar da fonte de exposição ser única. Além disso, o longo período de incubação da doença pode dificultar a investigação epidemiológica dos surtos (OLSEN et al., 2005). Neste contexto, os métodos de tipagem desempenham um papel fundamental em estudos epidemiológicos envolvendo esse patógeno.

A subtipagem de micro-organismos é uma ferramenta importante na vigilância de enfermidades transmitidas por alimentos, na elucidação de um surto e no rastreamento do patógeno na cadeia produtiva de alimentos. A diferenciação do

micro-organismo, além da identificação da espécie, contribui para um melhor entendimento de sua ecologia e patogenicidade (WIEDMANN et al., 2002).

A subtipagem de micro-organismos pode ser realizada por métodos fenotípicos ou genotípicos. A escolha do método apropriado para uso em estudos epidemiológicos deve levar em consideração, além da sensibilidade e especificidade, a facilidade de execução e interpretação dos resultados, os custos do trabalho e de materiais, o tempo necessário para realização do teste, assim como reprodutibilidade da técnica (GASANOV; HUGUES; HANSBRO, 2005). Nos últimos anos, os métodos fenotípicos de tipagem, como sorologia e fagotipagem, têm sido complementados ou substituídos por métodos moleculares, que apresentam maior sensibilidade, reprodutibilidade e poder discriminatório (LIU, 2006). Geralmente, em estudos epidemiológicos utilizam-se pelo menos duas técnicas diferentes, garantindo uma melhor avaliação da diversidade existente em uma determinada população (NIGHTINGALE, 2010).

A sorotipagem molecular de isolados de *L. monocytogenes* pode ser realizada segundo DOUMITH et al. (2004a), na qual pesquisa-se quatro genes por PCR multiplex: *prs*, *Imo0737*, *Imo1118*, ORF2819 e ORF2110. A técnica permite separar os isolados em quatro grupos sorológicos: Grupo 1, que contém os sorotipos 1/2a e 3a (amplificação dos fragmentos *prs* e *Imo0737*); Grupo 2, que contém os sorotipos 1/2c e 3c (amplificação dos fragmentos *prs*, *Imo0737* e *Imo1118*); Grupo 3, que contém os sorotipos 1/2b, 3b e 7 (amplificação dos fragmentos *prs* e ORF2819) e Grupo 4, que contém os sorotipos 4b, 4d e 4e (amplificação dos fragmentos *prs*, ORF2819 e ORF2110). O fragmento *prs* é amplificado nos sorotipos 4a e 4c, e nas demais espécies de *Listeria*.

Alguns isolados, no entanto, podem apresentar um perfil atípico com a amplificação de quatro fragmentos, sendo um característico do gênero *Listeria* (*prs*); dois do grupo 4 (ORF2819 e ORF2110) e um presente nos grupos 1 e 2 (*Imo0737*). Quando submetidos à sorologia convencional, os isolados com este perfil são identificados como pertencentes ao sorotipo 4b (CHIARINI, 2007; VASCONCELOS et al., 2008; LEE et al., 2012). O sequenciamento do gene *Imo0737* de isolados 4b atípicos e de isolados da linhagem II (sorotipos 1/2a e 1/2c), realizado por LECLERCQ et al. (2011) e LEE et al. (2012), demonstrou homologia acima de 94%

entre as sequências de nucleotídeos, o que sugere a transferência horizontal do gene *Imo0737* entre isolados das linhagens II e I (sorotipo 4b) . LECLERCQ et al. (2011) propõem, ainda, a classificação dos isolados atípicos em um novo sorogrupo denominado 4b – variante 1.

A avaliação da diversidade genética entre isolados de *L. monocytogenes* pode ser realizada por diferentes métodos moleculares como: ribotipagem, PGFE (*Pulsed-field gel electrophoresis*), RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PCR-RFLP (*PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism*), REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromes*), ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequences*), MLVA (*Multilocus Variable Number of Tandem Repeat Analysis*), MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e SNP (*Single Nucleotide Polymorphism analysis*) (NIGHTINGALE, 2010; JADHAV; BHAVE; PALOMBO, 2012). Dentre estas técnicas, PFGE apresenta elevada sensibilidade, reprodutibilidade e alto poder discriminatório, sendo considerada “padrão ouro” na tipagem de micro-organismos. Protocolos de PFGE foram padronizados pela rede internacional *PulseNet* para tipagem de diversos patógenos transmitidos por alimentos, incluindo *L. monocytogenes* (CDC, 2013a). PFGE tem sido amplamente utilizada na elucidação de surtos de listeriose, rastreabilidade do patógeno ao longo da cadeia produtiva e avaliação da diversidade genética em isolados provenientes de amostras clínicas, alimentos, animais e ambiente (BRITO et al., 2008; NUCERA et al., 2010; GAULIN; RAMSAY; BEKAL, 2012; JACKSON et al., 2011; KOCH et al., 2010; GALVÃO et al., 2012).

A análise da sequência do gene *actA*, altamente polimórfico, é considerada uma alternativa econômica e com alto poder discriminatório para tipagem e análise filogenética de *L. monocytogenes* (CAI et al., 2002; ZHOU; JIAO; WIEDMANN, 2005; BANIA et al., 2009; LÓPEZ; NAVAS; MARTÍNEZ-SUAREZ, 2013). No Brasil, a análise de sequências deste gene foi utilizada para avaliar a diversidade genética de 40 isolados, constituídos por diferentes sorotipos, provenientes da cadeia produtiva de frangos (ARAÚJO et al., 2011) e de 72 isolados de origem humana e alimentos,

pertencentes ao sorotipo 4b (BARBOSA et al., 2012), possibilitando a identificação de diferentes linhagens de *L. monocytogenes*.

A escassez de dados na literatura brasileira sobre a caracterização de isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de alimentos, deixa uma lacuna no entendimento do potencial de virulência e da diversidade genética deste patógeno. Os dados gerados no presente estudo visam ampliar o conhecimento sobre as características fenotípicas e genotípicas de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, importante em um processo de Avaliação de Risco Microbiológico.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Listeria monocytogenes* obtidos de salsicha bovina e produtos cárneos crus (carne moída, coxa de frango, e lingüiça) refrigerados comercializados no município de São Paulo.

Objetivos específicos:

- Avaliar a resistência antimicrobiana por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC – *Minimum inhibitory concentration*).
- Verificar a presença de marcadores de virulência (genes *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *hlyA*, *actA*, *prfA*, *iap*, *plcA*, *plcB* e *mpl*) nos isolados de *L. monocytogenes*;
- Determinar os perfis genéticos por eletroforese em campo pulsado (PFGE) e analisar a diversidade genética entre os isolados de *L. monocytogenes*.
- Sequenciar os produtos da amplificação do gene *Imo0737* dos isolados identificados como atípicos pela sorotipagem molecular para confirmar a sua identidade;
- Sequenciar parcialmente o gene *actA* para avaliar a variabilidade genética, deste fragmento, nos isolados de *L. monocytogenes*;
- Realizar a análise filogenética do gene *actA* nos isolados de *L. monocytogenes*;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolados de *L. monocytogenes*

Para realização deste estudo foram selecionados 439 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de amostras de salsicha e produtos cárneos crus (linguiça, carne moída e coxa de frango) refrigerados, em estudo realizado por RISTORI (2010). As amostras foram adquiridas entre maio de 2008 a julho de 2009, em supermercados e hipermercados de diferentes regiões (oeste, leste, norte, sul e centro) do município de São Paulo e analisadas empregando-se as metodologias descritas no *International Organization for Standardization* (ISO 11290-1:1996/Amd.1:2004 e ISO 11290-2:1998). O perfil de sorotipagem molecular destes isolados foi determinado segundo DOUMITH et al. (2004a). Os isolados estavam conservados a -20°C em caldo TSB-YE contendo glicerol. A distribuição dos isolados de acordo com a origem e perfil de sorotipagem molecular encontra-se descrita na Tabela 1.

Tabela 1. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular.

	Perfis de sorotipagem						TOTAL
	Grupo 1 (1/2a e 3a)	Grupo 2 (1/2c e 3c)	Grupo 3 (1/2b, 3b e 7)	Grupo 4 (4b, 4d e 4e)	4a ou 4c	atípica	
Salsicha	19	8	32	15	0	8	82
Lingüiça	41	18	11	10	0	2	82
Carne moída	7	38	22	22	0	53	142
Coxa de frango	60	29	9	14	1	20	133
TOTAL	127	93	74	61	1	83	439

Fonte: Ristori (2010)

3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana

Dentre os 439 isolados, 416 foram avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular, submetidos à avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana.

	Perfis de sorotipagem						TOTAL
	Grupo 1 (1/2a e 3a)	Grupo 2 (1/2c e 3c)	Grupo 3 (1/2b, 3b e 7)	Grupo 4 (4b, 4d e 4e)	4a ou 4c	atípica	
Salsicha	19	8	30	14	0	7	78
Linguiça	37	18	11	9	0	2	77
Carne moída	6	38	21	19	0	53	137
Coxa de frango	54	28	8	13	1	20	124
TOTAL	116	92	70	55	1	82	416

Fonte: Ristori (2010)

Os testes foram realizados por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC – *Minimum Inhibitory Concentration*), empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com a metodologia recomendada pelo CLSI (2009). Os seguintes antibióticos foram utilizados: ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, tetraciclina, vancomicina, clindamicina, rifampicina e penicilina (Sigma-Aldrich); sulfametoxazol (Fluka)/ trimetoprim (Sigma) e ciprofloxacina (Fluka). As concentrações empregadas para cada antimicrobiano e os pontos de corte (concentrações que determinam se o isolado é resistente, intermediário ou resistente) estão descritos na Tabela 3. Resumidamente, as placas de microtitulação para realização do antibiograma foram preparadas da seguinte maneira: a partir da solução inicial de cada antimicrobiano (mantida a – 20°C) foram realizadas diluições seriadas em tubos contendo caldo Muller-Hinton cátion ajustado suplementado com 3% de sangue de cavalo desfibrinado e lisado, para obtenção das concentrações desejadas. Alíquotas de 50 µL de cada diluição foram transferidas para placas de microtitulação com 96 poços (fundo em U). Na última sequência de poços de cada placa (A12-H12) era distribuído 50 µL de meio de cultura sem antibiótico. As placas foram conservadas à - 20°C até o momento do

uso. Para preparar o inóculo foram realizados dois repiques do isolado de *L. monocytogenes* em ágar TSA-YE a 37°C por 18-20 horas. A partir da cultura em TSA-YE, realizou-se uma suspensão, com auxílio de um swab, em solução salina a 0,85 % esterilizada. A suspensão foi ajustada de acordo com a escala 0,5 de McFarland e, em seguida, diluída 1/100 em caldo Muller Hinton cátion ajustado, suplementado com 3% de sangue de cavalo. Alíquotas de 50 µL dessa diluição foram transferidas para as placas que foram incubadas a 37°C por 20-24 horas. A leitura das placas era realizada visualmente sobre uma lâmpada fluorescente. Como controle de qualidade foram utilizadas as cepas padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 para gentamicina e *Streptococcus pneumoniae* para os demais antimicrobianos. A última sequência de poços contendo o meio de cultura, sem antibiótico, era utilizada como controle de crescimento do inóculo. O valor do MIC foi determinado como a menor concentração do antibiótico capaz de inibir o desenvolvimento do micro-organismo, ou seja, o valor da concentração do antimicrobiano no poço que, visivelmente, não apresentava turvação era considerado como o valor da concentração inibitória mínima para o isolado testado. O MIC50 (valor em que 50% dos micro-organismos são inibidos) e MIC90 (valor em que 90% dos micro-organismos são inibidos) foram calculados para cada antimicrobiano. Para interpretação dos resultados da penicilina, ampicilina e trimetoprim-sulfametoxazol foram adotados os critérios estabelecidos para *Listeria* spp. (CLSI, 2009) e para os demais antibióticos foram utilizados os critérios estabelecidos para *Staphylococcus* spp (CLSI, 2011), conforme Tabela 3.

Tabela 3. Concentrações empregadas para cada antibiótico e critérios estabelecidos pelo CLSI para interpretação dos resultados (pontos de corte).

Antibiótico	Faixa de concentração empregada (µg/ mL)	Pontos de corte (µg/ mL) ^a		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Ampicilina	0,015 – 16	≤ 2	--	--
Cloranfenicol	0,06 – 64	≤ 8	16	≥ 64
Ciprofloxacina	0,015 – 16	≤ 1	2	≥ 16
Clindamicina	0,015 – 16	≤ 0,5	1-2	≥ 16
Eritromicina	0,015 – 16	≤ 0,5	1-4	≥ 8
Gentamicina	0,03 – 32	≤ 4	8	≥ 16
Rifamicina	0,015 – 16	≤ 1	2	≥ 16
Tetraciclina	0,03 – 32	≤ 4	8	≥ 16
Vancomicina	0,03 - 32	≤ 2	4-8	≥ 16
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	0,015 – 16/ 304 – 0,29	≤ 0,5/ 9,5	1/19-2/38	≥ 4/76
Penicilina	0,015 - 16	≤ 2	--	--

^aSegundo critérios estabelecidos pelo CLSI (2009; 2011).

3.3 Pesquisa dos genes de virulência

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada nos 439 isolados (Tabela 1) por PCR, sendo três multiplex (*inlA*, *inlC* e *inlJ*; *hlyA*, *prfA* e *iap*; *plcA*, *plcB* e *mpl*) e uma simplex (*actA*). Os genes de virulência *inlA*, *inlC* e *inlJ* foram pesquisados de acordo metodologia descrita por LIU et al. (2007b); os genes *hlyA*, *actA*, *prfA* e *iap* segundo KAUR et al. (2007) e os genes *plcA*, *plcB* e *mpl* segundo CONTER et al. (2010), com modificações nas quantidades dos *primers*, tempo/temperatura dos ciclos de amplificação e pesquisa do gene *actA* por PCR simplex. Além dos *primers*

descritos por NORTEMANS et al. (1991) para pesquisa do gene *prfA*, em alguns isolados utilizou-se também os *primers* LIP descritos por D' AGOSTINO et al. (2004) para detecção deste gene. As sequências de nucleotídeos empregadas como *primers* estão descritas na Tabela 4. Como controle positivo utilizou-se as cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 19112 e ATCC 19114, e como controle negativo água destilada ultra pura livre de DNase/RNase (Invitrogen, EUA).

Tabela 4. Sequências de nucleotídeos utilizadas como *primers* para detecção dos genes de virulência.

Gene	Sequência (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>inlA</i>	5' ACGAGTAACGGGACAAATGC 3' 3' CCCGACAGTGGTGCTAGATT 5'	800	LIU et al., 2007b
<i>inlC</i>	5' AATTCCCACAGGACACAACC 3' 3' CGGGAATGCAATTTTTCTACTA 5'	517	LIU et al., 2007b
<i>inlJ</i>	5' TGTAACCCCGCTTACACAGTT 3' 3' AGCGGCTTGGCAGTCTAATA 5'	238	LIU et al., 2007b
<i>lap</i>	5' ACAAGCTGCACCTGTTGCAG 3' 3' TGACAGCGTGTGTAGTAGCA 5'	131	FURRER et al., 1991
<i>hlyA</i>	5' GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA 3' 3' GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG 5'	456	PAZIAK-OMANSKA et al., 1999
<i>actA</i>	5' CGCCGCGGAAATTAATAAAGA 3' 3' ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG 5'	839	KAUR et al., 2007
<i>prfA</i>	5' CTGTTGGAGCTCTTCTTGGTGAAGCAATCG 3' 3' AGCAACCTCGGTACCATATACTAATC 5'	1060	NOTERMANS et al., 1991
<i>prfA</i> (LIP)	5' GTGTAATCTTGATGCCATCAGG3' 3' GCCAACCGATGTTTCTGTATC5'	274	D'AGOSTINO et al., 2004
<i>plcA</i>	5' CCGCGGACATCTTTTAATGT 3' 3' CGAGCAAAACAGCAACGATA 5'	129	LEIMEISTER-WACHTER et al., 1991
<i>plcB</i>	5' GGGAAATTTGACACAGCGTT 3' 3' ATTTTCGGGTAGTCCGCTTT 5'	261	VAZQUEZ-BOLAND et al., 1992
<i>mpl</i>	5' TTAAAAAGGAGCGGTGAAAT 3' 3' TTGTTCTGGAATTGAGGATG 5'	502	CONTER et al., 2010

3.3.1 Extração do DNA

Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification System (Promega, EUA), seguindo as instruções do fabricante. O material extraído foi armazenado a -20°C.

3.3.2 Amplificação do DNA extraído

A PCR multiplex para detecção dos genes *inlA*, *inlC* e *inlJ* foi realizada a partir de uma solução contendo 2 µL de DNA; 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix [200 µM de cada dNTP e 1,5 mM MgCl₂ (pH 8,5)] (Promega, EUA); os *primers* (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA) nas concentrações de 10 pmoles para *inlA* e *inlC* e 7 pmoles para *inlJ* e água livre de DNase e RNase (ultraPURE™) para um volume final de reação de 25 µL. Para realização das outras duas PCR multiplex (*plcA*, *plcB* e *mpl*; *prfA*, *hlyA* e *iap*), da PCR simplex (*actA*) e *prfA* (LIP) foram utilizados os mesmo padrões descritos anteriormente e as seguintes concentrações dos *primers*: 10 pmoles de *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *iap*, *actA* e LIP e 12 pmoles de *mpl* e *prfA*.

As amplificações foram realizadas em termociclador Endurance TC-412 (Techne, EUA) empregando-se diferentes condições descritas na Tabela 5. Os produtos amplificados foram armazenados a 4°C.

Tabela 5. Condições de temperatura e tempo empregadas para amplificação dos genes de virulência nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus.

Genes	Aquecimento	Ciclo (n = 35)			Extensão final
		Desnaturação	Anelamento	Extensão	
<i>inlA, inlC e inlJ</i>	95°C/ 5 min	95°C/ 30 seg	56°C/ 45 seg	72°C/ 60 seg	72°C/ 5 min
<i>plcA, plcB e mpl</i>	94°C/ 3 min	94°C/ 60 seg	53°C/ 2 min	72°C/ 60 seg	72°C/ 5 min
<i>prfA, hlyA e iap</i>	95°C/ 5 min	95°C/ 15 seg	58°C/ 30 seg	72°C/ 90 seg	72°C/ 10 min
<i>actA</i>	95°C/ 5 min	95°C/ 15 seg	58°C/ 30 seg	72°C/ 90 seg	72°C/ 5 min
<i>prfA</i> (LIP)	95°C/ 5 min	95°C/ 15 seg	58°C/ 30 seg	72°C/ 90 seg	72°C/ 10 min

3.3.3 Detecção dos produtos amplificados

Os produtos gerados na PCR foram separados em gel de agarose (Invitrogen, EUA[®]) a 1,3% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA [pH 8.0]), contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Um volume de 7 µL do produto amplificado foi aplicado no gel de agarose e submetido à eletroforese, em cuba horizontal, em tampão TBE (Apelex, França[®]) a 60 Volts por 10 min e 100 Volts por 1 h (fonte PS 1006, Apelex, França). Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 bp (Promega, EUA). Após a corrida, o gel foi visualizado com o auxílio do sistema de fotodocumentação Gel Logic 200 (Kodak) acoplado a um computador, sob transiluminação UV.

3.4 Determinação dos perfis genéticos de cepas de *L. monocytogenes* por PFGE

Dentre os 439 isolados, 166 foram selecionados aleatoriamente para avaliação da diversidade genética por eletroforese em campo pulsado (PFGE), conforme Tabela 6.

Tabela 6. Distribuição do número de isolados de acordo a origem e perfil de sorotipagem molecular, submetidos à eletroforese em campo pulsado (PFGE).

	Perfis de sorotipagem						TOTAL
	Grupo 1 (1/2a e 3a)	Grupo 2 (1/2c e 3c)	Grupo 3 (1/2b, 3b e 7)	Grupo 4 (4b, 4d e 4e)	4a ou 4c	atípica	
Salsicha	5	4	7	6	0	6	28
Lingüiça	7	7	5	3	0	2	24
Carne moída	3	8	9	8	0	48	76
Coxa de frango	6	7	0	5	1	19	38
TOTAL	21	26	21	22	1	75	166

A PFGE foi realizada de acordo com o protocolo descrito por GRAVES; SWAMINATHAN (2001), utilizando-se a enzima Apal. Os isolados congelados foram reativados em TSB-YE a 37°C por 24 horas. Em seguida, foram realizados dois repiques em TSA-YE a 37° C por 24 horas. As colônias foram ressuspensas em tampão TE I (10 mM Tris-HCl: 1 mM EDTA pH 8,0) e tratadas com lisozima (10 mg/ mL) a 37°C por 10 minutos. Ao tubo contendo as células tratadas foi adicionado solução SDS (1,2% de Agarose para PFGE, 1% de SDS e 0,2 mg/ mL de proteinase K) e após homogeneização, volumes adequados foram distribuídos nos moldes acrílicos (BioRad, USA) para formação dos blocos. Após solidificação dos blocos, os mesmos foram tratados com solução de lise (50 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% de sarcosina e 0,2 mg/ mL de proteinase K) a 54°C por 2 horas. Em seguida, foram realizadas duas lavagens sucessivas dos blocos com 5 mL de água Milli-Q (pré-aquecida a 54°C) a 54°C por 10 minutos cada. Após esta etapa, foram realizadas quatro lavagens com 5 mL de TE I (pré-aquecida a 54°C) a 54°C por 15 minutos cada. Após a última lavagem, adicionou-se em cada tubo 5 mL de TE I (temperatura ambiente). Os blocos foram mantidos em TE I a 4°C. A digestão de um bloco foi realizada com a enzima Apal (10U/ mL) (New England, Biolabs), conforme

instruções do fabricante. Os produtos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose para PFGE (BioRad, USA) a 1% em TBE 0,5X (Tris-Borato 45 mM; EDTA 1 mM pH 8,0), empregando-se o equipamento Chef DR III Chiller System (BioRad) e os seguintes parâmetros de corrida: voltagem 6V/ cm; ângulo de 120°; tempo de corrida 21 horas, a 14°C e intervalo de pulsos de 4 a 40 segundos. Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/ mL) por 45 minutos e visualizado em luz ultravioleta com auxílio do equipamento Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems. Os programas GelWorks 1D Advanced – UVP, versão 4.01 e GelWorks 1D Database 1.12 – UVP Bioimaging, Upland, CA foram utilizados para análise estatística dos fragmentos. Os perfis foram agrupados segundo coeficiente de Pearson. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Lambda Ladder PFG Marker (New England, Biolabs).

3.5 Avaliação da variabilidade genética pelo sequenciamento parcial do gene *actA*

Os produtos da amplificação do gene *actA* foram sequenciados em 155 isolados. Dentre estes, 97 isolados foram selecionados para a análise filogenética e avaliação da variabilidade genética, utilizando-se os *primers* actAf e actAr (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA), e o kit *ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®), seguindo as instruções do fabricante. A reação de sequenciamento foi realizada a partir de uma solução contendo: 10-30 ng do produto da PCR para o gene *actA* (item 3.3.2), 2 µL de Tampão *Save Money* 5X (Tris-HCl 200 mM pH 9,0; 5mM MgCl₂), 5 pmoles do *primer* sense ou anti-sense, 2 µL do kit *ABI PRISM* e água livre de DNase e RNase (ultraPURE™ Invitrogen) para completar um volume final de 10 µL. Este procedimento foi efetuado separadamente para cada um dos *primers*. Todas as reações foram realizadas em quadruplicata, sendo duas reações de sequenciamento com o *primer forward* e duas com o *reverse*.

As reações foram realizadas em um termociclador Endurance TC-412 (Techne, EUA) empregando-se as seguintes condições: aquecimento inicial a 96°C por 1 min, seguido de 35 ciclos a 96 °C por 15 seg, 50 °C por 15 seg e extensão final a 60 °C por 4 min. O produto obtido foi mantido a 4 °C até o momento da purificação.

3.5.1 Purificação dos produtos da reação de sequenciamento

Os produtos obtidos foram purificados, visando à remoção de excesso de dideoxinucleotídeos “terminadores” e *primers* presentes na reação, utilizando-se o kit *Big Dye® X-Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems®)*, seguindo as instruções do fabricante. Em 10 µL da reação de sequenciamento foram adicionados 10 µL do *X-Terminator* e 45 µL de tampão da reação (SAM'S). Após homogeneização por 30 minutos, seguido de uma centrifugação a 1000 x g por 1 minuto, os produtos foram submetidos à eletroforese em polímero POP6 (*Applied Biosystems®*), utilizando o sequenciador automático ABI-PRISM modelo 3100 (*Applied Biosystems®*). As amostras foram alinhadas automaticamente com o *software* do Analisador Automático de DNA *ABI Prism* modelo 3100.

3.5.2 Alinhamento das sequências

As sequências de nucleotídeos correspondentes à região *actA* foram analisadas e editadas com o programa *SeqMan* do pacote *Expert Analysis Software* (DNASTAR, Inc., EUA). As sequências de nucleotídeos consenso foram alinhadas com sequências de cepas de referência *L. monocytogenes* EGD-e (número de acesso AL591974), *L. monocytogenes* ATCC 19114 (JN703931) e *L. monocytogenes* ATCC 19115 (JN703935) e com outras sequências, provenientes de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de fontes diversas (alimentos, ambiente, animais e de origem humana) (AY512476, EU372056, EU302052, EU373036, AY512454, AY512392, AY512412, AY512490, EU372037, AY512402, FJ041131, FJ110435, AY512497, AY512433, AY512446, FJ041144), além de sequências obtidas para isolados do Brasil em estudo realizado por NALÉRIO (2009) (FJ151004, FJ151005, FJ150994, FJ150972, FJ150992), todas disponíveis no GenBank (www.ncbi.nih.gov). Para o alinhamento utilizou-se o programa Clustal W do BioEdit versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA)

Com o intuito de otimizar as análises subsequentes, selecionou-se aleatoriamente, apenas uma amostra de cada grupo de sequências idênticas. Desta

forma, sequências que apresentaram pelo menos uma mudança no número ou posição de nucleotídeos foram submetidas à análise filogenética.

3.6 Análise filogenética do gene *actA*

Os arquivos gerados pelo programa Clustal W do BioEdit versão 7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA) foram utilizados para construção da árvore filogenética e caracterização dos genótipos, empregando-se o programa MEGA versão 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2007). A árvore foi gerada com o algoritmo *Neighborn joining* e para verificação da sustentação de ramos na topologia da árvore foram calculados os valores de *bootstrap*, com 1000 réplicas.

3.7 Sequenciamento do gene *lmo0737* dos isolados identificados como atípicos pela sorotipagem molecular

Os produtos da amplificação do gene *lmo0737* (DOUMITH et al., 2004a) de 20 isolados identificados como atípicos, selecionados aleatoriamente, foram sequenciados utilizando-se os *primers* lmo0737f e lmo0737r (IDT, Integrated DNA Technologies, EUA), conforme descrito nos itens 3.5, 3.5.1 e 3.5.2.

4. RESULTADOS

4.1 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

Os resultados da avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos 416 isolados de *L. monocytogenes*, obtidos de salsicha e de produtos cárneos crus, mostraram que 114 (27,4%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados, 300 (72,1%) apresentaram resistência intermediária a uma ou mais drogas e apenas dois isolados (0,5%) foram resistentes a um ou mais antibióticos. Multi-resistência (dois ou mais antibióticos) foi observada em apenas um isolado (0,2%).

Com relação aos antibióticos avaliados, todos os isolados foram sensíveis à ampicilina, gentamicina e vancomicina. Resistência antimicrobiana foi verificada frente à penicilina, tetraciclina e clindamicina. Alguns isolados apresentaram resistência intermediária à cloranfenicol (2,4%), eritromicina (0,2%), clindamicina (69,2%), ciprofloxacina (22,4%), rifamicina (0,25) e trimetoprim/sulfametoxazol (0,7%) (Tabela 7).

Tabela 7. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus.

Antibióticos	N° (%)		
	Sensível ^a	Intermediário	Resistente
Ampicilina	416 (100%)	0	0
Cloranfenicol	406 (97,6%)	10 (2,4%)	0
Ciprofloxacina	323 (77,6%)	93 (22,4%)	0
Clindamicina	127 (30,6%)	288 (69,2%)	1 (0,2%)
Eritromicina	413 (99,3%)	1 (0,2%)	0
Gentamicina	416 (100%)	0	0
Rifamicina	415 (99,8%)	1 (0,2%)	0
Tetraciclina	415 (99,8%)	0	1 (0,2%)
Vancomicina	416 (100%)	0	0
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	413 (99,1%)	3 (0,7%)	0
Penicilina	415 (99,8%)	0	1 (0,2%)

^aSegundo critérios estabelecidos pelo CLSI (2009; 2011).

Resistência antimicrobiana foi observada em apenas dois isolados. Um isolado do grupo 1 (1/2a ou 3a), proveniente de linguiça, apresentou resistência à penicilina (MIC 4 µg/mL) e clindamicina (MIC 16 µg/mL), e o outro isolado identificado como sorotipo 4a ou 4c, obtido de coxa de frango, apresentou resistência para tetraciclina (MIC 32 µg/mL) (Figuras 3 e 4; Tabelas 8 e 9). Estes dois isolados também apresentaram resistência intermediária a outros antibióticos (Tabela 10).

Resistência intermediária foi observada em todos os sorogrupos avaliados, entretanto, excluindo-se o sorotipo 4a ou 4c em que apenas um isolado foi avaliado, as maiores taxas foram verificadas para isolados grupo 2 (1/2a e 3a), seguido do grupo 1 (1/2c e 3c), isolados atípicos, grupo 4 (4b, 4d e 4e) e grupo 3 (1/2b, 3b e 7) (Figura 3). A clindamicina e a ciprofloxacina foram os antibióticos que mais

contribuíram para os elevados índices de resistência intermediária, especialmente entre os isolados do grupo 2 e 1 (Tabela 8).

Com relação ao perfil de susceptibilidade entre isolados pertencentes a diferentes categorias de produtos cárneos, verificou-se que os índices de resistência intermediária foram similares entre os isolados provenientes de carne moída, coxa de frango e linguiça. Uma taxa menor foi observada para os isolados obtidos de salsicha (Figura 4).

Nove perfis de resistência foram identificados entre os isolados de *L. monocytogenes*, com predominância do perfil de resistência intermediária à clindamicina, principalmente, entre os isolados do sorogrupo 1 (1/2a e 3a), 2 (1/2a e 3a) e atípicas (Tabela 10).

Figura 3 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus de acordo com o **sorogrupo** identificado por sorotipagem molecular segundo DOUMITH et al. (2004a).

Tabela 8. Distribuição do número e porcentagem de isolados de *L. monocytogenes* de acordo com o perfil de susceptibilidade observado em cada sorogrupo.

Sorogrupo	N° de isolados	N° (%)																							
		CLO ^a			CIP			CLIN			ERI			RIF			TET			TRI/SUL			PEN		
		S ^b	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Grupo 1	116	113 (97,4)	3 (2,6)	0	83 (71,5)	33 (28,5)	0	24 (20,7)	91 (78,4)	1* (0,9)	115 (99,1)	1 (0,9)	0	115 (99,1)	1 (0,9)	0	116 (100)	0	0	115 (99,1)	1 (0,9)	0	115 (99,1)	0	1* (0,9)
Grupo 2	92	90 (97,8)	2 (2,2)	0	55 (59,8)	37 (40,2)	0	7 (7,6)	85 (92,4)	0	92 (100)	0	0	92 (100)	0	0	92 (100)	0	0	92 (100)	0	0	92 (100)	0	0
Grupo 3	70	69 (98,6)	1 (1,4)	0	67 (95,7)	3 (4,3)	0	49 (70)	21 (30)	0	70 (100)	0	0	70 (100)	0	0	70 (100)	0	0	70 (100)	0	0	70 (100)	0	0
Grupo 4	55	53 (96,4)	2 (3,6)	0	50 (90,9)	5 (9,1)	0	24 (43,6)	31 (56,4)	0	55 (100)	0	0	55 (100)	0	0	55 (100)	0	0	54 (98,2)	1 (1,8)	0	55 (100)	0	0
4a ou 4c	1	1 (100)	0	0	0	1 (100)	0	0	1 (100)	0	1 (100)	0	0	1 (100)	0	0	0	0	1 (100)	0	1 (100)	0	1 (100)	0	0
Atípicas	82	80 (97,6)	2 (2,4)	0	68 (82,9)	14 (17,1)	0	23 (28)	59 (72)	0	82 (100)	0	0	82 (100)	0	0	82 (100)	0	0	82 (100)	0	0	82 (100)	0	0
Total N (%)	416	406 (97,6)	10 (2,4)	0	323 (77,6)	93 (22,4)	0	127 (30,6)	288 (69,2)	1 (0,2)	415 (99,8)	1 (0,2)	0	415 (99,8)	1 (0,2)	0	415 (99,8)	0	1 (0,2)	413 (99,3)	3 (0,7)	0	415 (99,8)	0	1 (0,2)

^aAntimicrobianos: CLO, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CLIN, clindamicina; ERI, eritromicina; RIF, rifamicina; TET, tetraciclina; TRI/SUL, trimetoprim/sulfametoxazol; PEN, penicilina.

^bPerfil de susceptibilidade antimicrobiana de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI (2009; 2011): S (sensível); I (intermediário), R (resistente).

*resistência apresentada pelo mesmo isolado

Figura 4 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana em isolados de *L. monocytogenes* obtidos salsicha e produtos cárneos crus de acordo com a **origem (produto cárneo)**.

Tabela 9. Distribuição do número e porcentagem de isolados de *L. monocytogenes* de acordo com o perfil de susceptibilidade e origem (produto cárneo).

Origem	N° de isolados avaliados	N° (%)																							
		CLO ^a			CIP			CLIN			ERI			RIF			TET			TRI/SUL			PEN		
		S ^b	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Carne moída	137	133 (97,1)	4 (2,9)	0	104 (75,9)	33 (24,1)	0	44 (32,1)	93 (67,9)	0	137 (100)	0	0	137 (100)	0	0	137 (100)	0	0	137 (100)	0	0	137 (100)	0	0
Coxa de frango	124	120 (96,8)	4 (3,2)	0	95 (76,6)	29 (23,4)	0	30 (24,2)	94 (75,8)	0	124 (100)	0	0	92 (100)	0	0	123 (99,2)	0	1 (0,8)	123 (99,2)	1 (0,8)	0	124 (100)	0	0
Linguiça	77	77 (100)	0	0	61 (79,2)	16 (20,8)	0	21 (27,3)	55 (71,4)	1* (1,3)	76 (98,7)	1 (1,3)	0	76 (98,7)	1 (1,3)	0	77 (100)	0	0	75 (97,4)	2 (2,6)	0	76 (98,7)	0	1* (1,3)
Salsicha	78	76 (94,4)	2 (2,6)	0	63 (80,8)	15 (19,2)	0	32 (41)	46 (59)	0	78 (100)	0	0	78 (100)	0	0	78 (100)	0	0	78 (100)	0	0	78 (100)	0	0
Total N (%)	416	406 (97,6)	10 (2,4)	0	323 (77,6)	93 (22,4)	0	127 (30,6)	288 (69,2)	1 (0,2)	415 (99,8)	1 (0,2)	0	415 (99,8)	1 (0,2)	0	415 (99,8)	0	1 (0,2)	413 (99,3)	3 (0,7)	0	415 (99,8)	0	1 (0,2)

^aAntimicrobianos: CLO, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; CLIN, clindamicina; ERI, eritromicina; RIF, rifamicina; TET, tetraciclina; TRI/SUL, trimetoprim/sulfametoxazol; PEN, penicilina.

^bPerfil de susceptibilidade antimicrobiana de acordo com critérios estabelecidos pelo CLSI (2009; 2011): S (sensível); I (intermediário), R (resistente).

*resistência apresentada pelo mesmo isolado

Tabela 10. Distribuição do número de isolados de *L. monocytogenes* de acordo com os sorogrupos e os diferentes perfis de resistência ou resistência intermediária.

Perfil ^a	Número de isolados					
	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Atípicas	4a ou 4c
CIPRO ^I	5	--	2	1	5	--
CLIN ^I	62	48	19	24	49	--
CLIN ^I +CIPRO ^I	25	35	1	4	8	--
CLIN ^I +CLO ^I	2	--	1	2	1	--
CLIN ^I +CIPRO ^I +CLO ^I	1	2	--	--	1	--
CLIN ^I +TRI/SUL ^I	--	--	--	1	--	--
CLIN ^I +TRI/SUL ^I +CIPRO ^I	1	--	--	--	--	--
TET^R + CLIN ^I +TRI/SUL ^I +CIPRO ^I	--	--	--	--	--	1
CLIN^R + PEN^R +ERI ^I +CIPRO ^I +RIF ^I	1	--	--	--	--	--
Total	97	85	23	32	64	1

^aAntimicrobianos: Cloranfenicol (CLO), Ciprofloxacina (CIP), Clindamicina (CLIN), Eritromicina (ERI), Rifamicina (RIF), Tetraciclina (TET), Trimetoprim/Sulfametoxazol (TRI/SUL), Penicilina (PEN).

^IResistência intermediária

^RResistência

A distribuição do número de isolados de acordo com o valor do MIC apresentado para cada antibiótico encontra-se nas Tabelas 11 e 12. As concentrações capazes de inibir 50% (MIC50) e 90% (MIC90) dos micro-organismos estão apresentadas na Tabela 13. Dentre os 11 antibióticos avaliados, em seis observou-se valores de $\text{MIC}_{90} \leq 0,5 \mu\text{g/ mL}$, indicando uma alta atividade contra *L. monocytogenes*.

Tabela 11. Distribuição do número e porcentagem de isolados de *L. monocytogenes* de acordo com o valor do MIC apresentado para os diferentes antibióticos.

Antimicrobiano	N° (%) de isolados de acordo com o valor do MIC (µg/ mL)												
	≤0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Ampicilina	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)	41 (9,9%)	273 (65,6%)	91 (21,9%)	7 (1,7%)	2 (0,5%)	0	0	0		
Cloranfenicol			0	0	0	0	0	0	25 (6,0%)	381 (91,6%)	9 (2,2%)	1 (0,2%)	0
Ciprofloxacina	0	0	0	6 (1,4%)	13 (3,1%)	51 (12,3%)	253 (60,8%)	83 (20%)	9 (2,2%)	1 (0,2%)	0		
Clindamicina	0	0	0	2 (0,5%)	23 (5,6%)	102 (24,5%)	172 (41,3%)	104 (25%)	12 (2,9%)	0	1 (0,2%)		
Eritromicina	0	0	1 (0,2%)	147 (35,4%)	254 (61,1%)	13 (3,1%)	1 (0,2%)	0	0	0	0		
Gentamicina		0	16 (3,9%)	209 (50,2%)	133 (32%)	48 (11,6%)	8 (1,9%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0	0	0	
Rifamicina	59 (14,2%)	129 (31,1%)	148 (35,6%)	53 (12,7%)	18 (4,3%)	8 (1,9%)	0	0	0	1 (0,2%)	0		
Tetraciclina		0	0	0	0	6 (1,4%)	99 (23,8%)	289 (69,5%)	21 (5,1%)	0	0	1 (0,2%)	
Vancomicina		0	0	0	1 (0,2%)	26 (6,3%)	370 (88,9%)	19 (4,6%)	0	0	0	0	
Penicilina	1 (0,2%)	0	1 (0,2%)	15 (3,6%)	295 (71%)	93 (22,4%)	9 (2,2%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0	0		

Áreas sombreadas (■) indicam a faixa de concentração testada para cada antibiótico.

Valores destacados em roxo referem-se a isolados com resistência intermediária; Valores destacados em vermelho referem-se a isolados com resistência antimicrobiana.

Tabela 12. Distribuição e porcentagem de isolados de *L. monocytogenes* de acordo com o MIC apresentado para Trimetoprim/Sulfametoxazol.

Antimicrobiano	N° (%) de isolados de acordo com o valor do MIC (µg/ mL)										
	≤0,015/0,29	0,03/0,59	0,06/1,18	0,125/2,37	0,25/4,75	0,5/9,5	1/19	2/38	4/76	8/152	16/304
Trimetoprim/ Sulfametoxazol	16 (3,9%)	168 (40,4%)	200 (48,1%)	25 (6%)	3 (0,7%)	1 (0,2%)	2 (0,5%)	1 (0,2%)	0	0	0

Area sombreada () indica a faixa de concentração testada para o antibiótico.

Valores destacados em roxo referem-se aos isolados com resistência intermediária.

Tabela 13 - Valores de MIC50 e MIC90 calculados para os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus frente aos antibióticos avaliados.

Antimicrobiano	MIC50 (µg/ mL)	MIC90 (µg/ mL)
Ampicilina	0,25	0,5
Cloranfenicol	8	8
Ciprofloxacina	1	2
Clindamicina	1	2
Eritromicina	0,25	0,25
Gentamicina	0,125	0,5
Rifamicina	0,06	0,125
Tetraciclina	2	2
Vancomicina	1	1
Penicilina	0,25	0,5
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,06/1,18	0,06/1,18

4.2 Pesquisa dos genes de virulência

Os genes de virulência *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *iap*, *hly*, *prfA* e *actA* foram observados em todos os 439 isolados de *L. monocytogenes* avaliados (Figuras 5, 6, 7 e 8).

Figura 5 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os *primers inlA*, *inlC* e *inlJ* nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -14: isolados positivos para os genes *inlA*, *inlC* e *inlJ*; 15: *L. monocytogenes* ATCC 19112 (controle positivo).

Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os *primers* *plcA*, *plcB* e *mpl* nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -13: isolados positivos para os genes *plcA*, *plcB* e *mpl*; 14: *L. monocytogenes* ATCC 19112 (controle positivo); 15: H₂O (controle negativo).

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para os *primers* *iap*, *hly* e *prfA* nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100 pb); 1 -9: isolados positivos para os genes *iap*, *hly* e *prfA*; 10: *L. monocytogenes* ATCC 19112 (controle positivo); 11: H₂O (controle negativo).

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose 1,3% dos produtos amplificados para o *primer actA* em isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus. PM: marcador de peso molecular (100pb). 1 – 7; 9 - 14: isolados com o gene *actA*; 8: controle positivo *L. monocytogenes* ATCC 19112 e 15: controle positivo *L. monocytogenes* ATCC 19114.

Embora todos os 439 isolados de *L. monocytogenes* tenham apresentado o gene *actA*, algumas particularidades foram observadas para esse gene. A amplificação deste gene foi verificada, inicialmente, em 421 isolados, sendo 18 considerados negativos. Para confirmar este resultado, os 18 isolados foram submetidos a novas reações de PCR modificando-se o ciclo de amplificação. Com a alteração da temperatura de anelamento de 58°C para 50°C, observou-se a presença de bandas, compatíveis com o peso molecular do gene *actA*, em todos os dezoito isolados. Dentre estes isolados, 17 pertenciam ao **grupo 1** (1/2a e 3a) e um era **atípico**. Estes isolados eram provenientes de coxa de frango (10), linguiça (7) e salsicha (1). Os produtos da amplificação destes isolados foram sequenciados, sendo confirmada a presença do gene.

Outra característica observada para gene *actA* foi a ocorrência de bandas com dois tamanhos de fragmentos (aproximadamente 840 e 940 bp) (Figura 8). Dentre os 439 isolados analisados, 36 (8,2%) apresentaram o fragmento menor (840 pb), sendo esta característica observada em 24,6% (15/61) dos isolados do **grupo 4**; 18,9% (14/74) do **grupo 3**; 4,8% (6/127) do **grupo 1** e em 1,2% (1/83) dos isolados **atípicos**. O fragmento de 840 pb não foi verificado em isolados do grupo 2.

Um resultado interessante foi observado também para o gene *prfA*. Entre as 439 amostras positivas, apenas 246 isolados apresentaram amplificação deste gene utilizando-se os *primers* (*prfAf* e *prfAr*) descritos por NOTERMANS et al. (1991). Após modificações no ciclo de amplificação, sem resultados satisfatórios, os 193 isolados, em que não se observou amplificação do gene, foram submetidos a uma nova reação de PCR utilizando-se os *primers* LIPf e LIPr descritos por D'AGOSTINO et al (2004). Com a utilização desses *primers*, todos 193 isolados foram positivos para o gene *prfA*. Dentre os 193 isolados, 71 (36,8%) eram **atípicos**, 64 (33,2%) do **grupo 3**, 57 (29,5%) do **grupo 4** e 1 (0,5%) do **sorotipo 4a ou 4c**. Todos os isolados do grupo 1 e 2 apresentaram resultado positivo com os *primers* descritos por NOTERMANS et al. (1991).

4.3 Sequenciamento parcial do gene *actA*

O sequenciamento parcial do gene *actA* foi realizado em 155 isolados, sendo que 97 isolados foram selecionados para avaliação da variabilidade genética e análise filogenética. Fragmentos de 673 nucleotídeos obtidos dos isolados sem deleção, correspondente a posição 559 a 1232 da sequência de nucleotídeos do gene *actA* e fragmentos de 568 nucleotídeos, dos isolados com deleção, foram comparados com outras sequências disponíveis no GenBank.

O sequenciamento parcial do gene mostrou a ocorrência de 14 sequências de nucleotídeos distintas entre os 97 isolados avaliados quando comparados com a cepa padrão EGD-e e entre si. As sequências obtidas foram identificadas de “A” a “N” (Tabela 14). No total foram observadas 43 substituições de nucleotídeos, sendo que 16 resultaram em mutações nas sequências de aminoácidos (Figuras 9 e 10). As mutações observadas em cada uma das 14 sequências estão destacadas no Quadro 1.

Para os isolados do grupo 1 (1/2a e 3a) foram observadas sete (A, E, F, G, H, I e J) sequências de nucleotídeos diferentes para o segmento do gene *actA* analisado, sendo que a maioria (16/26) apresentou mutações em pelos menos dois resíduos de aminoácidos e em dez isolados verificou-se a presença de sequências idênticas à da cepa EGD-e. Com relação aos isolados do grupo 2, as 16 sequências analisadas (A) apresentaram 100% de homologia com a cepa padrão EGD-e, portanto, não foram encontradas mutações.

Nos isolados do grupo 3 (1/2b, 3b e 7) foram detectadas quatro sequências (B, D, M e L) de nucleotídeos diferentes, com alterações que resultaram em mutações nas sequências de aminoácidos. Quanto aos isolados do grupo 4 (4b, 4d e 4e), três sequências foram identificadas (B, K e L). No entanto, embora as sequências de nucleotídeos identificadas como M e N tenham sido consideradas diferentes em função da alteração de uma base, as sequências de aminoácidos foram idênticas, além de apresentarem mutações em relação à EDG-e. Entre os isolados atípicos uma única sequência foi observada (C) contendo mutações em sete resíduos de aminoácidos.

A maioria das mutações foi verificada nos diferentes sorogrupos avaliados, com exceção das mutações Glu266Lys, Phe329Ser e Leu398Met que foram encontradas somente no grupo 1 (1/2a e 3a). Além das substituições de nucleotídeos, nas sequências denominadas I, J, K, L, M e N verificou-se a presença de uma deleção de 105 pb (Figura 9), correspondente a 35 aminoácidos (Figura 10).

Tabela 14. Distribuição e identificação dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus de acordo com a sequência do gene *actA*.

Sequência <i>actA</i>	Nº de isolados	Sorogrupo (nº de isolados)	Identificação dos isolados (nº do isolado e ano de isolamento)	Origem dos isolados
A	26	1/2a e 3a (10)	Br441_2008, Br591_2008, Br 2734_2009, Br59_2008, Br641_2008, Br2428_2009, Br260_2008, Br352_2008, Br882_2008, Br1331_2009	Carne moída, coxa de frango e linguiça
		1/2c e 3c (16)	Br5_2008 ^a , Br106_2008, Br1375_2009, Br1431_2009, Br1542_2009, Br1779_2009, Br1933_2009, Br2040_2009, Br2044_2009, Br2108_2009, Br147_2008	Carne moída, coxa de frango, linguiça e salsicha
B	23	1/2b,3b,7 (13)	Br34_2008, Br1062_2008, Br1274_2009, Br1578_2009, Br1615_2009, Br1692_2009, Br1713_2009, Br2305_2009, Br2345_2009, Br2278_2009, Br2434_2009, Br2456_2009, Br629_2009	Carne moída, linguiça e salsicha
		4b, 4d e 4e (10)	Br522_2008, Br1171_2008, Br1484_2009, Br1623_2009, Br1630_2009, Br2171_2009, Br2602_2009, Br2668_2009, Br2510_2009, Br2604_2009	Carne moída, coxa de frango e salsicha
C	18	Atípicos (18)	Br107_2008, Br312_2008, Br 961_2008, Br1164_2008, Br1230_2008, Br1379_2009, Br1404_2009, Br1544_2009, Br1974_2009, Br1986_2009, Br2079_2009, Br2760_2009, Br2115_2009, Br2553_2009, Br429_2008, Br1885_2009, Br1491_2009, Br2141_2009	Carne moída, coxa de frango, linguiça e salsicha
D	1	1/2b, 3b e 7	Br486_2008	Salsicha
E	1	1/2a e 3a (1)	Br1176_2008	Linguiça
F	6	1/2a e 3a (6)	Br116_2008, Br2247_2009, Br1509_2009, Br 2504_2009, Br2507_2009, Br2070_2009	Coxa de frango, linguiça e salsicha
G	1	1/2a e 3a (1)	Br1144_2008	Linguiça
H	2	1/2a e 3a (2)	Br2220_2009, Br2258_2009	Coxa de frango e linguiça
I	6	1/2b,3b e 7 (6)	Br533_2008, Br504_2008, Br534_2008, Br1654_2009, Br356_2008, Br355_2008	Carne moída, coxa de frango e salsicha
J	6	1/2a e 3a (6)	Br612_2008, Br2211_2009, Br843_2008, Br1028_2008, Br1451_2009, Br1832_2009	Coxa de frango, linguiça e salsicha
K	2	4b, 4d e 4e (2)	Br1055_2008, Br1582_2009	Coxa de frango e linguiça
L	1	4b, 4d e 4e (1)	Br1584_2009	Linguiça
M	2	1/2b, 3b e 7 (2)	Br1758_2009, Br1678_2009	Salsicha
N	3	1/2b,3b e 7 (3)	Br152_2008, Br169_2008, Br1802_2009	Carne moída

^aO isolado de *L. monocytogenes* representante de cada uma das 14 sequências obtidas para o gene *actA* encontra-se destacado em amarelo.

Figura 09 – Representação do alinhamento de nucleotídeos do fragmento do gene *actA* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (.) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. Continua

Continuação da **Figura 09.**

	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840
AL591974 (EGD)	TTAATTGACCAATTATTAAACCAAAAGTGAAGAGGTAAATGCTTCGGACTTCCCGCCACCACTACGGATGAAGAGTTAAGACTTGCTTGCCAGAGACACCAATGCTTCTGGT											
EU372056 (FSL S6-072)											G	
EU372052 (FSL S4-766)											G	C
EU372036 (FSL E1-123)											G	C
AY512392 (NRRL33002)											G	C
AY512454 (NRRL33128)											G	C
AY512490 (NRRL33219)											G	C
AY512476 (NRRL33181)								G			G	C
FJ041135 (NRRLB-33378)		T	G	AG			T	A		A		
AY512497 (NRRL33229)		T	G	A			T	A				
FJ041131 (NRRLB-33374)		T	G	A			T	A	T		GT	
JN703935 (ATCC19115)		T	G	A			T	A			G	
Br5_2008												
Br1062_2008		T	G	A			T	A			G	
Br107_2008		T	G	A			T	A	G		G	
Br1176_2008											G	C
Br2247_2009											G	C
Br1144_2008								A				
Br2220_2009											G	C
Br486_2008		T	G	A			T	A			G	
FJ150992 (isolate 32)		T	G	A			T	A			G	
FJ151005 (isolate 94)												
FJ151004 (isolate 91)												
JN703931 (ATCC19114)		T	G	A			T	AG			G	
EU372037 (FSLN4-290)											G	C
AY512402 (NRRL33014)											G	
AY512412 (NRRL33034)											G	C
AY512433 (NRRL33077)		T	G	A			T	AG			G	
AY512446 (NRRL33115)		T	G	A	A		T	AG	G		G	
FJ041144 (NRRLB-33407)		T	G	AG			T	A			G	
Br169_2008		T	G	A			T	A			G	
Br1055_2008		T	G	A			T	A			G	
Br1451_2009											G	C
Br1584_2009		T	G	A			T	A			G	
Br1654_2009		T	G	A			T	A	G		G	
Br1758_2009		T	G	A			T	A			G	
FJ150994 (isolate 42)		T	G	A			T	A			G	
FJ150972 (isolate 2)		T	G	A			T	A	G		G	

Continuação da **Figura 09**.

	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960
AL591974 (EGD)	TTTAA	TGCTC	CTGCT	ACATC	AGAAC	CCGAG	CTCAT	TTCGA	TTTCC	ACCAC	CCACCT	ACGGAT
EU372056 (FSL S6-072)		A										
EU372052 (FSL S4-766)		A										
EU372036 (FSL E1-123)		A										
AY512392 (NRRL33002)		A										
AY512454 (NRRL33128)		A										
AY512490 (NRRL33219)		A	C		G							
AY512476 (NRRL33181)		A								TA		
FJ041135 (NRRLB-33378)								A				
AY512497 (NRRL33229)									A		A	
FJ041131 (NRRLB-33374)					G					TA		
JN703935 (ATCC19115)			G									
Br5_2008												
Br1062_2008			G									
Br107_2008												
Br1176_2008												
Br2247_2009		A										
Br1144_2008												
Br2220_2009		A	C		G			G	G			
Br486_2008					G							
FJ150992 (isolate 32)			G									
FJ151005 (isolate 94)												
FJ151004 (isolate 91)												
JN703931 (ATCC19114)			G			G	G	T	A			
EU372037 (FSLN4-290)		A	C		G		G	T	A			
AY512402 (NRRL33014)					G		T	A				
AY512412 (NRRL33034)		A	C		G		G	T	A			
AY512433 (NRRL33077)					G		G	T	A			
AY512446 (NRRL33115)			T		G		G	T	A			
FJ041144 (NRRLB-33407)		A			G		G	T	A			
Br169_2008			G			G	T	A				
Br1055_2008			G			T	A					
Br1451_2009		A	C		G		G	T	A			
Br1584_2009					G		T	A				
Br1654_2009					G		T	A				
Br1758_2009					G		T	A				
FJ150994 (isolate 42)			G			G	T	A				
FJ150972 (isolate 2)			G			G	T	A				

Continuação da **Figura 09**.

	970	980	990	1000	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080
AL591974 (EGD)	ACATCGGAACCGAGCTCGTTTCGAATTTCCACCGCCTCCAAACAGAAGATGAACCTAGAAATCATCCGGGAAACAGCATCCTCGCTAGATTCTAGTTTACAAGAGGGGATTAGCTAGTTTG											
EU372056 (FSL S6-072)		A				T	G			C		
EU372052 (FSL S4-766)		A				T	G			C		
EU372036 (FSL E1-123)						T	G			C		
AY512392 (NRRL33002)						T	G			C		
AY512454 (NRRL33128)		A			G	T	G			C		
AY512490 (NRRL33219)			A			T	G			C		
AY512476 (NRRL33181)	A		A		G	T	G		G	C		CA
FJ041135 (NRRLB-33378)	GC		A		G	T	G			C		
AY512497 (NRRL33229)			A			T	G			C		
FJ041131 (NRRLB-33374)	G		A			T	G			C		
JN703935 (ATCC19115)		A				T	G			C		
Br5_2008												
Br1062_2008		A				T	G			C		
Br107_2008		A				T	G			C		
Br1176_2008		A				T	G			C		
Br2247_2009		A				T	G			C		
Br1144_2008			C									
Br2220_2009		A				T	G			C		
Br486_2008		A				T	G			C		
FJ150992 (isolate 32)		A				T	G			C		
FJ151005 (isolate 94)						T	G			C		
FJ151004 (isolate 91)												
JN703931 (ATCC19114)						T	G			C		C
EU372037 (FSLN4-290)												
AY512402 (NRRL33014)						T	G			C		
AY512412 (NRRL33034)						T	G			C		
AY512433 (NRRL33077)						T	G			C		
AY512446 (NRRL33115)						T	G		G	C		
FJ041144 (NRRLB-33407)						T	G			C		
Br169_2008						T	G			C		
Br1055_2008						T	G			C		
Br1451_2009						T	G			C		
Br1584_2009						T	G			C		
Br1654_2009						T	G			C		
Br1758_2009						T	G			C		
FJ150994 (isolate 42)						T	G			C		
FJ150972 (isolate 2)						T	G			C		

Continuação da **Figura 09**

	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
AL591974 (EGD)	AGAAATGCTATTAATCGCCATAGTCAAAAATTCTCTGATTTCCTCCACCAATCCCAACAGAAAGAGATTGAACGGGAGAGGCGGTAGACCAACATCTGAAGAATTAGTTCGCTGAATAGT											
EU372056 (FSL S6-072)	G.....CG.....											
EU372052 (FSL S4-766)	G.....CG.....											
EU372036 (FSL E1-123)	G.....CG.....T.....T.....											
AY512392 (NRRL33002)	G.....CG.....T.....A.A.....G.....G.....											
AY512454 (NRRL33128)	G.....CG.....G.....A.....											
AY512490 (NRRL33219)	G.....CG.....											
AY512476 (NRRL33181)	G.....CG.....T.....											
FJ041135 (NRRLB-33378)	G.....CG.....											
AY512497 (NRRL33229)	G.....C.....G.....T.....											
FJ041131 (NRRLB-33374)	G.....CG.....											
JN703935 (ATCC19115)	G.....C.....T.....G.....T.....T.....											
Br5_2008	G.....C.....T.....G.....T.....T.....											
Br1062_2008	G.....C.....T.....G.....T.....T.....											
Br107_2008	G.....C.....T.....T.....											
Br1176_2008	G.....C.....											
Br2247_2009	G.....CG.....											
Br1144_2008	G.....											
Br2220_2009	G.....CG.....											
Br486_2008	G.....C.....T.....T.....											
FJ150992 (isolate 32)	G.....CG.....A.A.....G.....G.....A.....											
FJ151005 (isolate 94)	G.....CG.....											
FJ151004 (isolate 91)	G.....CG.....											
JN703931 (ATCC19114)	G.....CG.....											
EU372037 (FSLN4-290)	G.....CG.....T.....G.....A.A.....G.....G.....A.....											
AY512402 (NRRL33014)	G.....CG.....											
AY512412 (NRRL33034)	G.....CG.....A.....											
AY512433 (NRRL33077)	G.....CG.....T.....											
AY512446 (NRRL33115)	G.....C.....											
FJ041144 (NRRLB-33407)	G.....CG.....											
Br169_2008	G.....C.....T.....T.....											
Br1055_2008	G.....C.....T.....T.....G.....T.....T.....											
Br1451_2009	G.....CG.....A.....											
Br1584_2009	G.....C.....T.....T.....T.....T.....											
Br1654_2009	G.....C.....T.....G.....T.....T.....											
Br1758_2009	G.....C.....T.....T.....											
FJ150994 (isolate 42)												
FJ150972 (isolate 2)												

Continuação da Figura 09.

	1210	1220	1230
AL591974 (EGD)	GGTGA	TTTACAGATGACG	AAAAACAGCGAGAC
EU372056 (FSL S6-072)			
EU372052 (FSL S4-766)			
EU372036 (FSL E1-123)			
AY512392 (NRRL33002)			
AY512454 (NRRL33128)			.T.....
AY512490 (NRRL33219)			
AY512476 (NRRL33181)			
FJ041135 (NRRLB-33378)			
AY512497 (NRRL33229)			
FJ041131 (NRRLB-33374)			
JN703935 (ATCC19115)	..C.....		
Br5_2008			
Br1062_2008	..C.....		
Br107_2008			
Br1176_2008			
Br2247_2009			
Br1144_2008			
Br2220_2009			
Br486_2008	..C.....		
FJ150992 (isolate 32)			
FJ151005 (isolate 94)			
FJ151004 (isolate 91)			
JN703931 (ATCC19114)			
EU372037 (FSLN4-290)			.T.....
AY512402 (NRRL33014)			
AY512412 (NRRL33034)			.T.....
AY512433 (NRRL33077)			
AY512446 (NRRL33115)			
FJ041144 (NRRLB-33407)			.T.....
Br169_2008			
Br1055_2008	..C.....		
Br1451_2009			.T.....
Br1584_2009	..C.....		
Br1654_2009	..C.....		
Br1758_2009			
FJ150994 (isolate 42)			
FJ150972 (isolate 2)			

Continuação da **Figura 09**.

Figura 10 – Representação do alinhamento das sequências de aminoácidos do fragmento do gene *actA* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (·) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. Continua

	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
AL591974 (EGD)	LIDQLLT	KKKSEEVNASD	FPFPPPTDEELRLALP	ETPMLLGFNAPATSE	PSSEFFPPPPPTDEELRLALP	ETPMLLGFNAPATSE	PSSEFFPPPPPTDEELRLALP	ETPMLLGFNAPATSE	PSSEFFPPPPPTDEELRLALP	ETPMLLGFNAPATSE	PSSEFFPPPPPTDEELRLALP	ETPMLLGFNAPATSE
EU372056 (FSL S6-072)				T						M	P	S
EU372052 (FSL S4-766)				T						M	P	S
EU372036 (FSL E1-123)				T						M	P	S
AY512392 (NRRL33002)				T						M	P	S
AY512454 (NRRL33128)				T					G	M	P	S
AY512490 (NRRL33219)				TP						M	P	S
AY512476 (NRRL33181)			R	T			I			M	G	SR
FJ041135 (NRRLB-33378)		K						P		M	P	S
AY512497 (NRRL33229)		N								M	P	S
FJ041131 (NRRLB-33374)		N	L	S			I	G		M	P	S
JN703935 (ATCC19115)		N								M	P	S
Br5_2008												
Br1062_2008		N								M	P	S
Br107_2008		N								M	P	S
Br1176_2008										M	P	S
Br2247_2009				T						M	P	S
Br1144_2008			K					S				
Br2220_2009				TP						M	P	S
Br486_2008		N								M	P	S
FJ150992 (isolate 32)		N								M	P	S
FJ151005 (isolate 94)										M	P	S
FJ151004 (isolate 91)												
JN703931 (ATCC19114)		N	A							M	P	S
EU372037 (FSLN4-290)				TP								
AY512402 (NRRL33014)										M	P	S
AY512412 (NRRL33034)				TP						M	P	S
AY512433 (NRRL33077)		N	A							M	P	S
AY512446 (NRRL33115)		N	L	A	V					M	G	S
FJ041144 (NRRLB-33407)		K		D						M	P	S
Br169_2008		N								M	P	S
Br1055_2008		N								M	P	S
Br1451_2009				TP						M	P	S
Br1584_2009		N								M	P	S
Br1654_2009		N								M	P	S
Br1758_2009		N								M	P	S
FJ150994 (isolate 42)		N								M	P	S
FJ150972 (isolate 2)		N								M	P	S

Continuação da **Figura 10**.

	370	380	390	400	410
AL591974 (EGD)					
EU372056 (FSL S6-072)	RNAINRHSQNFSDFPPIPTTEELNNGRGGRPTSEEFSSLSNGDFTDDENSE				
EU372052 (FSL S4-766)	.S.....E.....				
EU372036 (FSL E1-123)	.S.....E.....S.....				
AY512392 (NRRL33002)	.S.....E.....Y.....D.....G.....				
AY512454 (NRRL33128)	.S.....E.....G.....M.....				
AY512490 (NRRL33219)	.S.....E.....				
AY512476 (NRRL33181)	.S.....E.....I.....				
FJ041135 (NRRLB-33378)	.S.....E.....				
AY512497 (NRRL33229)	.S.....				
FJ041131 (NRRLB-33374)	.S.....E.....				
JN703935 (ATCC19115)	.S.....M.....I.....				
Br5_2008					
Br1062_2008	.S.....M.....I.....				
Br107_2008	.S.....I.....				
Br1176_2008					
Br2247_2009	.S.....E.....				
Br1144_2008					
Br2220_2009	.S.....E.....				
Br486_2008	I.....				
FJ150992 (isolate 32)					
FJ151005 (isolate 94)					
FJ151004 (isolate 91)					
JN703931 (ATCC19114)	.S.....E.....				
EU372037 (FSLN4-290)	G.D.....G.....M.....				
AY512402 (NRRL33014)	.S.....E.....				
AY512412 (NRRL33034)	.S.....E.....M.....				
AY512433 (NRRL33077)	.S.....E.....				
AY512446 (NRRL33115)	.S.....				
FJ041144 (NRRLB-33407)	.S.....E.....				
Br169_2008	.S.....I.....				
Br1055_2008	.S.....LM.....I.....				
Br1451_2009	.S.....E.....M.....				
Br1584_2009	.S.....L.....I.....				
Br1654_2009	.S.....M.....I.....				
Br1758_2009	.S.....I.....				
FJ150994 (isolate 42)					
FJ150972 (isolate 2)					

Continuação da **Figura 10**.

Quadro 1. Distribuição das mutações nas diferentes sequências de aminoácidos identificadas para o gene *actA* nos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus.

Sequências actA	Mutações															
	Ser194Thr	Gln203Lys	Ser251Asn	Glu266Lys	Ala285Thr	Thr286Pro	Phe329Ser	Ile341Met	Ser346Pro	Arg354Ser	Asn362Ser	Gln369Glu	Pro376Leu	Ile377Met	Arg389Ile	Leu398Met
A																
B																
C																
D																
E																
F																
G																
H																
I																
J																
K																
L																
M																
N																

Áreas sombreadas indicam presença da mutação; Áreas em branco indicam ausência da mutação.

Aminoácidos: **Ser** (Serina), **Thr** (Treonina), **Gln** (Glutamina), **Lys** (Lisina), **Asn** (Asparagina), **Glu** (Ácido glutâmico), **Ala** (Alanina), **Pro** (Prolina), **Phe** (Fenilalanina), **Leu** (Leucina), **Ile** (Isoleucina), **Met** (Metionina), **Arg** (Arginina).

Para a análise filogenética do gene *actA*, foram incluídas as 14 sequências obtidas neste estudo e outras disponíveis no *GenBank* conforme descrito no item 3.5.2. Segmentos de 498 pb das sequências de nucleotídeos foram consideradas para esta análise. Na árvore, gerada pelo programa MEGA 4.0, foram identificados três *clusters* (A, B e C) (Figura 11) representando as três linhagens (I, II e III) descritas na literatura para *L. monocytogenes*. No *cluster* A foram agrupados todos

os isolados do grupo 1 (1/2a e 3a) e grupo 2 (1/2c e 3c) e no *cluster* C, os isolados pertencentes ao grupo 3 (1/2b, 3b e 7), grupo 4 (4b, 4d e 4e) e atípicos. Nenhum isolado, avaliado neste estudo, foi agrupado no *cluster* B composto por isolados da linhagem III (4a, 4c e 4b atípico).

Figura 11- Análise filogenética das sequências do gene *actA* de *L. monocytogenes*, isoladas de salsicha e produtos cárneos crus comercializadas no município de São Paulo, comparadas com sequências depositadas no GenBank. Os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos cárneos, avaliados neste estudo, encontram-se destacados.

4.4 Sequenciamento do gene *lmo0737* dos isolados identificados como atípicos pela sorotipagem molecular

Fragmentos amplificados do gene *lmo0737* de 20 isolados atípicos, sendo seis provenientes de **coxa de frango** (Br94_2008, Br107_2008, Br299_2008, Br681_2008, Br813_2008, Br975_2008), oito de **carne moída** (Br101_2008, Br137_2008, Br225_2008, Br280_2008, Br358_2008, Br426_2008, Br825_2008, Br966_2008), quatro de **salsicha** (Br160_2008, Br969_2008, Br1118_2008, Br1120_2008) e duas de **linguiça** (Br961_2008 e Br963_2008), selecionados aleatoriamente, foram parcialmente sequenciados.

Os produtos obtidos foram comparados com outras sequências disponíveis no GenBank: 10M198 (acesso HQ221548); 01070 (HQ123583); 0904 (acesso JN236007); 10M131 (HQ221544) e FSL R2-561 (CP002003).

A análise dos resultados do sequenciamento confirmou a presença do gene *lmo0737* nos 20 isolados e verificou-se 100% de homologia entre os fragmentos sequenciados (Figura 12).

Figura 12 – Representação do alinhamento de nucleotídeos do fragmento do gene *Imo0737* de *L. monocytogenes* isoladas de salsicha e produtos cárneos crus coletados no município de São Paulo. (-) indicam fragmento não sequenciado; (·) indicam bases iguais; bases diferentes encontram-se destacadas. Os isolados de *L. monocytogenes*, avaliados neste estudo, encontram-se destacados em amarelo. Continua.

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
HQ221548 (10M198)	AAAC	AACAAAAGAG	CACGGAAG	TGCTAGGTAACGAT	GTCTTAATTTTCGCTGGTAAATGGGAAGATGGTATTGATGAGAAAGTGTGGGCGATCCACTTGCTAAACAAGATGCAAAAG							
HQ123583 (01070)												
JN236007 (0904)												
HQ221544 (10M131)												
CP002003 (FSL R2-561)												
Br94_2008												
Br101_2008												
Br107_2008												
Br137_2008												
Br160_2008												
Br225_2008												
Br280_2008												
Br299_2008												
Br358_2008												
Br426_2008												
Br681_2008												
Br813_2008												
Br825_2008												
Br961_2008												
Br963_2008												
Br966_2008												
Br969_2008												
Br975_2008												
Br1118_2008												
Br1120_2008												

Continuação **Figura 12.**

Continuação Figura 12

	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	
HQ221548 (10M198)												
HQ123583 (01070)	AATCAGGTACACTCGCAATGACATTCTTAAATAGTTCAGTTGAAGGGGCGGATCAAGATACCAATTCGTTTGATTGCATTGATGATGAAAGAAACCGGTGCCGATATTCACGC											
JN236007 (0904)												
HQ221544 (10M131)	..C.....											
CP002003 (FSL R2-561)	..C.....											
Br94_2008												
Br101_2008												
Br107_2008												
Br137_2008												
Br160_2008												
Br225_2008												
Br280_2008												
Br299_2008												
Br358_2008												
Br426_2008												
Br681_2008												
Br813_2008												
Br825_2008												
Br961_2008												
Br963_2008												
Br966_2008												
Br969_2008												
Br975_2008												
Br1118_2008												

Continuação da **Figura 12.**

4.5 Determinação dos perfis genéticos dos isolados de *L. monocytogenes* por PFGE

A diversidade genética de 166 isolados de *L. monocytogenes* foi avaliada por eletroforese em campo pulsado (PFGE) utilizando-se a enzima de restrição ApaI. Cinco cepas de referência de *Listeria* spp. foram incluídas na análise. A identificação e as características dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus encontram-se descritas no Quadro 2.

Quadro 2. Identificação e características dos isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus submetidos à eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
3098	linguiça	Oeste	34	grupo 3	P11
3103	carne moida	Oeste	59	grupo 1	P19
3284	carne moida	Centro	101	atípica	P37
3285	coxa	Centro	107	atípica	P45
3285	coxa	Centro	108	atípica	P45
3286	linguiça	Centro	112	grupo 3	P43
3287	salsicha	Centro	116	grupo 1	P17
3289	coxa	Norte	106	grupo 2	P26
3290	carne moida	Norte	152	grupo 3	P6
3290	carne moida	Norte	169	grupo 3	P6
3543	coxa	Centro	72	grupo 2	P2
3545	linguiça	Centro	147	grupo 2	P26
3545	linguiça	Centro	149	grupo 2	P3
3547	salsicha	Centro	160	atípica	P45
3548	coxa	Centro	77	atípica	P45
3548	coxa	Centro	94	atípica	P45
3815	carne moida	Oeste	85	grupo 4	P12
3816	salsicha	Oeste	5	grupo 2	P27
4254	carne moida	Sul	134	atípica	P45
4254	carne moida	Sul	137	atípica	P45
4445	carne moida	Leste	225	atípica	P45
4447	linguiça	Leste	260	grupo 1	P19
4608	coxa	Norte	296	4a ou 4c	P50
4608	coxa	Norte	299	atípica	P47

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
4611	carne moida	Norte	280	atípica	P47
4611	carne moida	Norte	312	atípica	P45
4788	carne moida	Centro	358	atípica	P45
4788	carne moida	Centro	361	grupo 3	P15
5101	carne moida	Sul	426	atípica	P45
5101	carne moida	Sul	429	atípica	P45
5659	coxa	Norte	522	grupo 4	P36
5664	carne moida	Norte	533	grupo 3	P43
5664	carne moida	Norte	534	grupo 3	P43
6076	carne moida	Sul	591	grupo 1	P19
6078	carne moida	Sul	598	grupo 2	P3
6263	coxa	Oeste	641	grupo 1	P19
6265	linguiça	Oeste	625	grupo 2	P3
6266	carne moida	Oeste	629	grupo 3	P31
6703	coxa	Oeste	681	atípica	P45
6973	salsicha	Sul	744	grupo 2	P23
7197	salsicha	Leste	782	grupo 4	P13
7197	salsicha	Leste	784	grupo 4	P42
7402	coxa	Sul	813	atípica	P45
7404	salsicha	Sul	850	grupo 1	P19
7407	carne moida	Sul	825	atípica	P45
7775	coxa	Centro	882	grupo 1	P19
7776	salsicha	Centro	887	grupo 4	P13
7778	linguiça	Centro	866	grupo 1	P18

Destacado em verde: exemplo de isolados obtidos da mesma amostra de produto cárneo apresentando o mesmo perfil; em amarelo: exemplo de isolados obtidos da mesma amostra de produto cárneo apresentando perfil diferente; em azul: exemplo de isolados obtidos de uma mesma categoria de produto cárneo coletado em diferentes regiões apresentando o mesmo perfil.

Quadro 2. Continuação

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
7992	coxa	Leste	928	grupo 2	P28
8267	linguiça	Centro	961	atípica	P45
8267	linguiça	Centro	963	atípica	P45
8268	carne moida	Centro	966	atípica	P45
8268	carne moida	Centro	967	atípica	P45
8269	salsicha	Centro	969	atípica	P46
8269	salsicha	Centro	971	atípica	P46
8270	coxa	Centro	975	atípica	P45
8274	carne moida	Centro	982	grupo 2	P27
8449	salsicha	Centro	1028	grupo 1	P20
8685	carne moida	Norte	1037	grupo 4	P35
8686	salsicha	Norte	1062	grupo 3	P6
8983	salsicha	Sul	1118	atípica	P46
8984	carne moida	Sul	1123	atípica	P45
9200	carne moida	Oeste	1163	atípica	P45
9200	carne moida	Oeste	1164	atípica	P45
9200	carne moida	Oeste	1165	atípica	P33
9578	carne moida	Leste	1171	grupo 4	P36
9580	linguiça	Leste	1176	grupo 1	P49
9584	carne moida	Leste	1191	grupo 4	P35
361	carne moida	Oeste	1230	atípica	P45
362	carne moida	Oeste	1220	atípica	P45
530	carne moida	Sul	1274	grupo 3	P30
533	coxa	Sul	1285	grupo 4	P35

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
580	coxa	Oeste	1299	grupo 2	P29
679	carne moida	Leste	1331	grupo 1	P19
682	coxa	Leste	1337	grupo 4	P14
744	coxa	Sul	1375	grupo 2	P21
876	carne moida	Leste	1379	atípica	P45
876	carne moida	Leste	1381	atípica	P45
877	coxa	Leste	1419	grupo 1	P17
880	carne moida	Leste	1393	grupo 2	P1
880	carne moida	Leste	1431	grupo 2	P25
927	linguiça	Leste	1451	grupo 1	P20
929	carne moida	Leste	1404	atípica	P45
929	carne moida	Leste	1407	atípica	P45
931	coxa	Leste	1412	atípica	P45
1039	coxa	Oeste	1491	atípica	P45
1042	carne moida	Oeste	1472	atípica	P45
1138	carne moida	Norte	1478	grupo 4	P16
1139	coxa	Norte	1484	grupo 4	P16
1143	linguiça	Norte	1542	grupo 2	P4
1371	carne moida	Norte	1544	atípica	P46
1371	carne moida	Norte	1547	atípica	P45
1372	salsicha	Norte	1578	grupo 3	P39
1373	linguiça	Norte	1582	grupo 4	P13
1423	salsicha	Centro	1615	grupo 3	P48
1584	carne moida	Leste	1623	grupo 4	P36

Destacado em **rosa**: exemplo de isolados obtidos de amostras de produto cárneos diferentes coletados em um mesmo estabelecimento apresentando o mesmo perfil.

Quadro 2. Continuação

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
1586	salsicha	Leste	1630	grupo 4	P36
1670	salsicha	Oeste	1678	grupo 3	P7
1674	linguiça	Norte	1692	grupo 3	P6
1676	coxa	Oeste	1697	atípica	P45
1677	linguiça	Oeste	1703	grupo 4	P32
1812	carne moida	Leste	1705	atípica	P45
1815	salsicha	Leste	1758	grupo 3	P8
1816	carne moida	leste	1713	grupo 3	P10
1875	linguiça	Norte	1779	grupo 2	P1
2032	coxa	Norte	1832	grupo 1	P20
2074	salsicha	Norte	1846	grupo 2	P22
2080	linguiça	Norte	1866	grupo 1	P17
2236	carne moida	Sul	1871	atípica	P47
2238	carne moida	Sul	1885	atípica	P47
2238	carne moida	Sul	1889	atípica	P38
2238	carne moida	Sul	1890	atípica	P45
2241	linguiça	Sul	1933	grupo 2	P3
2306	carne moida	Sul	1944	atípica	P45
2307	coxa	Sul	1951	grupo 1	P17
2310	carne moida	Sul	1905	atípica	P45
2310	carne moida	Sul	1907	atípica	P45
2311	linguiça	Sul	1958	grupo 4	P35
2473	carne moida	Leste	1980	atípica	P47
2474	coxa	Leste	1986	atípica	P45

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
2529	carne moida	Leste	1974	atípica	P45
2529	carne moida	Leste	2006	atípica	P45
2530	coxa	Leste	2009	atípica	P47
2687	carne moida	Norte	2040	grupo 2	P1
2690	salsicha	Norte	2070	grupo 1	P17
2692	coxa	Norte	2079	atípica	P45
2750	salsicha	Leste	2044	grupo 2	P27
2752	coxa	Leste	2108	grupo 2	P3
3086	carne moida	Sul	2131	atípica	P45
3086	carne moida	Sul	2135	atípica	P45
3087	coxa	Sul	2137	atípica	P44
3087	coxa	Sul	2141	atípica	P45
3090	carne moida	Sul	2115	atípica	P45
3090	carne moida	Sul	2118	atípica	P45
3256	carne moida	Leste	2171	grupo 4	P34
3259	coxa	Leste	2172	grupo 4	P34
3316	coxa	Sul	2217	grupo 1	P18
3493	salsicha	Sul	2247	grupo 1	P17
3558	carne moida	Sul	2262	grupo 3	P40
3562	salsicha	Sul	2278	grupo 3	P5
3739	salsicha	Leste	2305	grupo 3	P9
3741	carne moida	Leste	2286	atípica	P45
3741	carne moida	Leste	2288	atípica	P45
3744	carne moida	Leste	2326	grupo 2	P27

Quadro 2. Continuação

Nº de identificação da amostra	Origem	Região de coleta	Nº do isolado	Sorogrupo	Perfil PFGE
3828	carne moida	Leste	2294	atípica	P45
3830	linguiça	Leste	2345	grupo 3	P6
3991	linguiça	Leste	2379	grupo 2	P1
4057	coxa	Sul	2416	atípica	P45
4061	linguiça	Sul	2434	grupo 3	P6
4314	coxa	Sul	2490	atípica	P45
4319	linguiça	Sul	2504	grupo 1	P17
4319	linguiça	Sul	2507	grupo 1	P17
4516	salsicha	Sul	2510	grupo 4	P36
4722	carne moida	Sul	2553	atípica	P47
4722	carne moida	Sul	2554	atípica	P45
4771	coxa	Sul	2595	atípica	P45
4772	carne moida	Sul	2560	atípica	P47
4772	carne moida	Sul	2564	atípica	P45
4774	salsicha	Sul	2602	grupo 4	P32
4778	carne moida	Sul	2620	grupo 2	P25
s/n	carne moida	Oeste	2668	grupo 4	P41
s/n	carne moida	Oeste	2680	grupo 2	P3
s/n	carne moida	Leste	2698	atípica	P45
s/n	coxa	Leste	2705	grupo 2	P24
s/n	salsicha	Leste	2758	atípica	P45
s/n	salsicha	Leste	2760	atípica	P45

No total foram identificados 50 perfis diferentes entre os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos cárneos, agrupados em cinco *clusters* (A, B, C, D e E) com similaridade de 69% (Figura 13). No *cluster* A foram agrupados somente isolados do grupo 2 (1/2c e 3c) (linhagem II), enquanto que no *cluster* B observou-se a presença de isolados do grupo 3 (1/2b e 3b) e do grupo 4 (4b, 4d e 4e) (pertencentes a linhagem I). No *cluster* B foram identificados, ainda, dois subgrupos, sendo um representado apenas por isolados do grupo 3 (B1) e outro por isolados do grupo 3 e 4 (B2). No *cluster* C foram agrupados os isolados do grupo 1 (1/2a e 3a) e 2 (1/2c e 3c) (linhagem II), e dois subgrupos também foram encontrados, um contendo apenas isolados do grupo 1 (C1) e outro composto pelo grupo 2 (C2). O *cluster* D (D1 e D2) é composto pelos isolados do grupo 3, grupo 4 e atípicos (linhagem I), e o *cluster* E pelas cepas de referência *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. innocua* IAL 1984, *L. ivanovii* IAL 1983, *L. welshimeri* IAL 1986 e *L. seeligeri* IAL 1985, e por dois isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos cárneos neste estudo, sendo um do grupo 1 e o outro identificado como 4a ou 4c.

Todos os *clusters*, com exceção do *cluster* E, são compostos por isolados provenientes de diferentes produtos cárneos e adquiridos em diversas regiões do município de São Paulo. Verificou-se também a ocorrência de isolados com diferentes perfis de resistência antimicrobiana em um mesmo *cluster*, bem como em um mesmo perfil. Alguns perfis foram detectados apenas em um dos períodos de coleta (2008 ou 2009), enquanto outros foram observados em ambos os períodos (Figura 13).

Figura 13 - Dendrograma do perfil genético obtido por eletroforese em campo pulsado (PFGE), utilizando-se a enzima Apal, em 166 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de salsicha e produtos cárneos crus e nas cepas de referência *L. innocua* IAL 1984, *L. monocytogenes* ATCC 19111, *L. seeligeri* IAL 1985, *L. ivanovii* IAL 1983 e *L. welshimeri* IAL 1986.

Dentre os 50 perfis identificados, sete foram observados em isolados atípicos; cinco em isolados pertencentes ao sorogrupo 1; 13 em isolados do sorogrupo 2; 14 em isolados do sorogrupo 3; 13 em isolados do grupo 4 e um referente ao isolado 4a ou 4c. Dentro de cada sorogrupo, alguns perfis foram encontrados somente em um determinado tipo de produto cárneo, enquanto outros estão distribuídos entre os diferentes produtos. A distribuição dos diferentes perfis gerados no PFGE para os isolados de *L. monocytogenes* está descrita na Tabela 15. O único isolado pertencente ao sorotipo 4a ou 4c avaliado (não consta na tabela), proveniente de coxa de frango, apresentou o perfil 50.

Tabela 15 – Distribuição dos diferentes perfis gerados na PFGE de acordo com a origem dos isolados de *L. monocytogenes* e sorogrupo.

	N° de isolados avaliados	Grupo 1 (1/2a e 3a)	Grupo 2 (1/2c e 3c)	Grupo 3 (1/2b e 3b)	Grupo 4 (4b, 4d e 4e)	Atípico
Carne moída	76	P19 (3) ^a	P1 (2), P3 (2), P25 (2) ^b , P27 (2)	P6 (2), P10 (1), P15 (1), P30 (1), P31 (1), P40 (1), P43 (2)	P12 (1), P16 (1), P34 (1), P35 (2), P36 (2), P41 (1)	P33 (1), P37 (1), P38 (1), P45 (38), P46 (1), P47 (6)
Coxa de frango	38*	P17 (2), P18 (1), P19 (2), P20 (1)	P2 (1), P3 (1), P21 (1), P24 (1), P26 (1), P28 (1), P29 (1)		P14 (1), P16 (1), P34 (1), P35 (1), P36 (1)	P44 (1), P45 (16), P47 (2)
Linguiça	24	P17 (3), P18 (1), P19 (1), P20 (1), P49 (1)	P1 (2), P3 (3), P4 (1), P26 (1)	P6 (3), P11 (1), P43 (1)	P13 (1), P32 (1), P35 (1)	P45 (2)
Salsicha	28	P17 (3), P19 (1), P20 (1)	P22 (1), P23 (1), P27 (2)	P5 (1), P6 (1), P7 (1), P8 (1), P9 (1), P39 (1), P48 (1)	P13 (2), P32 (1), P36 (2), P42 (1)	P45 (3), P46 (3)

^aIdentificação do perfil (destacado em vermelho o número de isolados apresentando o perfil).

^bOs perfis que foram encontrados apenas em um determinado tipo de produto cárneo encontram-se destacados em amarelo.

*Um isolado pertence ao sorotipo 4a ou 4c e não consta na tabela

Isolados de *L. monocytogenes* apresentando perfis idênticos no PFGE foram detectados em diferentes situações: provenientes de uma mesma amostra de produto cárneo (por exemplo, isolados 107 e 108); de produtos cárneos distintos coletados em um mesmo estabelecimento comercial (isolados 160, 77 e 94); de produtos cárneos distintos coletados em diferentes regiões do município de São Paulo; de um mesma categoria de produto cárneo coletado em diferentes regiões (isolados 312 e 358). Isolados de *L. monocytogenes* com perfis diferentes também foram encontrados em uma mesma amostra (isolados 147 e 149). Os isolados citados como exemplos estão destacados no Quadro 2.

Os isolados que apresentaram deleção de 105 pb no gene *actA* foram observados em diferentes perfis (P6, P7, P8, P13, P14, P20, P35, P42) distribuídos em quatro clusters (A, B, C e D). Além disso, verificou-se dentro de um mesmo perfil isolados com ou sem a deleção.

5. DISCUSSÃO

L. monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo responsável pela listeriose, uma doença rara, mas com elevada taxa de mortalidade (HUANG et al., 2011). Dentre as inúmeras proteínas envolvidas no ciclo de infecção desta bactéria, destacam-se a p60 (gene *iap*) e a internalina A (gene *inlA*) responsáveis pela adesão e entrada da bactéria na célula do hospedeiro, respectivamente; a listeriolisina O (gene *hly*), fosfolipases (genes *plcA* e *plcB*), metaloprotease (gene *mpl*), proteína ActA (gene *actA*), internalinas C (gene *inlC*) e J (gene *inlJ*) fundamentais para sobrevivência e disseminação intracelular e o ativador pleiotrófico PrfA (gene *prfA*) responsável pela regulação destes genes (VASQUÉZ-BOLAND et al., 2001).

Em virtude da heterogeneidade existente entre isolados de *L. monocytogenes* quanto ao potencial de virulência, diversos métodos têm sido utilizados para a avaliação desta característica neste patógeno. A pesquisa de genes de virulência, utilizando-se a PCR, tem sido aplicada como uma alternativa rápida e de baixo custo para identificação de isolados com potencial de virulência (SONI et al., 2013).

No presente estudo, os genes de virulência *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *iap*, *mpl*, *plcA*, *plcB*, *hly*, *actA* e *prfA* foram pesquisados em 439 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus e todos os genes foram detectados em 100% dos isolados avaliados. A ampla distribuição destes genes tem sido descrita em isolados de *L. monocytogenes* pertencentes a diferentes sorotipos e obtidos de fontes diversas (HASEGAWA et al., 2013; LOMONACO et al., 2012; HODZIC et al., 2011; BUENO et al., 2010; CONTER et al., 2009).

Com relação à pesquisa de genes que codificam internalinas, resultados similares, ao do presente estudo, têm sido descritos. MAMMINA et al. (2009) detectaram os genes *inlA*, *inlC* e *inlJ* em todos os 54 isolados de *L. monocytogenes*, pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, provenientes de casos esporádicos de listeriose na Itália. WIECZOREC et al. (2012) verificaram 100% de positividade para esses genes em 85 isolados obtidos de carne moída bovina, sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, assim como JAMALI et al. (2013) em 18 isolados de *L. monocytogenes*, distribuídos em três sorogrupos, obtidos de leite cru.

Por outro lado, em estudos conduzidos por VISWANATH et al. (2013) e LOMONACO et al. (2012), o gene *inlC* não foi detectado em isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4a ou 4c, obtidos de cogumelos e queijo

gorgonzola, respectivamente. Dentre os 97 isolados provenientes de produtos cárneos e vegetais, analisados por SHEN et al. (2013), um isolado, identificado como sorotipo 4a ou 4c, não apresentou os genes *inlC* e *inlJ*. CHEN et al. (2009) avaliaram 88 isolados obtidos de fontes diversas e relataram a ocorrência de um isolado, sorotipo 4a obtido de leite, negativo para os genes *inlC* e *inlJ* e quatro isolados, sorotipos 1/2a, provenientes de pescados negativos para *inlJ*. Os autores também detectaram um isolado, sorotipo 1/2b, obtido de pescado negativo para o gene *inlA*.

No Brasil, SANT'ANA et al. (2012) não detectaram os genes *inlC* e *inlJ* em 3% dos 62 isolados, sorotipos 4b ou 1/2b, provenientes de vegetais minimamente processados. BARBOSA et al. (2012) verificaram que dois isolados, dentre os 46 obtidos de produtos cárneos e pertencentes ao sorotipo 4b, foram negativos para o gene *inlA*.

É interessante notar que, nos estudos descritos anteriormente, a maioria dos isolados que não apresentaram os genes *inlC* ou *inlJ* pertenciam ao sorotipo 4a ou 4c. Estes sorotipos raramente estão associados com casos de listeriose, sendo encontrados com mais frequência em animais e no ambiente (DOUMITH et al., 2004a). Estudos realizados com isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4a demonstraram que, além de não apresentarem os genes *inlC* e *inlJ*, os mesmos são incapazes de causar mortalidade em camundongos, sendo considerados como não patogênicos (LIU et al., 2004; LIU et al., 2006). CHEN et al. (2009) também verificaram uma correlação entre a virulência relativa (%) e a presença/ausência do gene *inlJ* entre isolados pertencentes à diferentes sorotipos. Isolados com virulência relativa entre 30-100% em ensaios com camundongos foram positivos para o gene *inlJ*, enquanto que em isolados do sorotipo 4a, com virulência relativa de 0%, o gene *inlJ* não foi detectado. Vale ressaltar, no entanto, que há relatos na literatura de isolados do sorotipo 4a provenientes de casos esporádicos de listeriose em humanos (LOMONACO et al., 2008) e de produtos cárneos (SHEN et al., 2013) positivos para ambos os genes, assim como verificado no presente estudo para o único isolado pertencente ao sorotipo 4a ou 4c.

A pesquisa de genes de virulência pode ser considerada como um ponto de partida para se avaliar o potencial de virulência de um determinado isolado, uma vez que a ausência de um gene importante para o ciclo de infecção do patógeno pode indicar uma virulência atenuada ou mesmo que o isolado não é patogênico

(LOMONACO et al., 2012). Entretanto, estudos complementares devem ser realizados para melhor caracterização do potencial patogênico do micro-organismo, em virtude dos diversos fatores que podem comprometer a expressão do gene (DUODU et al., 2010) ou a estrutura da proteína (VAN STELTEN et al., 2010). Dentre esses fatores, as mutações desempenham papel importante no ciclo de evolução de *L. monocytogenes* e sua ocorrência em genes importantes para o ciclo de infecção deste patógeno podem comprometer sua virulência (TÉMOIN et al., 2008; CHEN et al., 2009; ROCHE et al., 2012; LEUNG et al., 2013).

Algumas particularidades observadas para o gene *actA*, neste estudo, nos conduziram a aprofundar a caracterização deste gene. Verificou-se a ocorrência de bandas com dois tamanhos de fragmento (840 pb e 940 pb), sendo o fragmento menor (840 pb) encontrado em 8,2% dos 439 isolados. Além disso, a amplificação deste gene em 18 isolados, só foi possível com a diminuição da temperatura de anelamento de 58°C para 50°C.

Dentre os genes de virulência descritos para *L. monocytogenes*, o *actA* destaca-se como um gene altamente polimórfico (ORSI et al., 2008). O sequenciamento parcial deste gene em 97 isolados mostrou a ocorrência de 14 sequências distintas. Resultados similares foram observados por ZHOU et al. (2005) e BANIA et al. (2009) que identificaram 14 sequências diferentes para esse gene em 40 isolados obtidos de fontes diversas (alimentos, esgoto e amostras clínicas) e em 49 isolados provenientes de alimentos e casos esporádicos de listeriose, respectivamente.

Verificou-se, ainda, pelo sequenciamento a ocorrência de uma deleção de 105 nucleotídeos na sequência de 21 isolados, o que explica a diferença observada nos tamanhos de fragmento. Esta deleção tem sido reportada em isolados de *L. monocytogenes* (CONTER et al., 2009; CHEN et al., 2009), sendo este um dos primeiros polimorfismos descritos na literatura para este patógeno (SMITH et al., 1996). Essa deleção ocorre em uma região contendo repetições de uma sequência rica em prolina (proline-rich repeat – PRR) no gene *actA*, levando a remoção de 35 aminoácidos correspondente a uma cópia da PRR (SMITH et al., 1996). Sugere-se que a motilidade intracelular é dependente do número de repetições *tandem* na região rica em prolina e que esta deleção pode comprometer a virulência do patógeno (GEESE et al., 2002). Entretanto, estudos de mutagênese têm mostrado que a relação entre a deleção na PRR e a patogenicidade de *L. monocytogenes* é

complexa. Experimentos realizados com culturas celulares sustentam que a ocorrência desta deleção no gene *actA* pode contribuir para a atenuação da virulência em alguns isolados (FRANCIOSA et al., 2005; ROBERTS; WIEDMANN, 2006). Segundo LIU et al. (2007a) esta alteração na proteína ActA pode ser um dos principais fatores associados com a virulência atenuada em isolados do sorotipo 4a (linhagem III). No entanto, outros estudos não encontraram correlação entre a presença de deleção no domínio PRR, da proteína ActA, e menor capacidade do patógeno em invadir células HeLa (CONTER et al., 2010) ou em formar placas de lise em células fibroblásticas L929 ou causar mortalidade em camundongos (CHEN et al., 2009). BALANDYTÉ et al. (2011) reportam, ainda, maior ocorrência de sequências do gene *actA* apresentando a deleção em isolados provenientes de amostras clínicas de animais e humanos, acometidos pela listeriose, do que naqueles obtidos do ambiente e alimentos. De maneira geral, a contribuição específica de polimorfismos no gene *actA*, particularmente na região de PRR, para a virulência de *L. monocytogenes* permanece incerta (ORSI et al., 2011).

Os fragmentos de menor tamanho (840 pb) foram observados com maior frequência entre os isolados do grupo 4 (4b, 4d e 4e) (23,6%) e do grupo 3 (1/2b, 3b e 7) (18,9%), e nenhum isolado do grupo 2 (1/2c e 3c) apresentou a deleção. Esses resultados estão de acordo com HAIN et al. (2012) que reportam uma maior ocorrência da deleção de 105 nucleotídeos, na região PRR, nos sorotipos 1/2b (77%) e 4b (51%) do que nos sorotipos 1/2a (7,5%). A ocorrência de deleção em sorotipos comumente envolvidos em casos de listeriose sugerem que outros mecanismos possam estar envolvidos na disseminação intra e intercelular de *L. monocytogenes*, independente da presença de uma proteína ActA totalmente funcional. Além disso, a presença da proteína *actA* intacta em *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2c e 3c sugere que estes sorotipos são possivelmente ancestrais aos demais CHEN et al. (2009).

Além da deleção de 105 nucleotídeos, foram observadas 43 substituições de nucleotídeos entre as sequências dos 97 isolados avaliados quando comparados com a cepa padrão EGD-e, sendo que 16 resultaram em mutações nas sequências de aminoácidos. Mutações foram observadas em todos os sorogrupos avaliados, com exceção do grupo 2 (1/2c e 3c) em que todas as sequências apresentaram 100% de homologia com a cepa de referência EGD-e. A proteína ActA é constituída por 639 aminoácidos contendo uma região N (domínio NH₂-terminal), uma região P

(domínio central) e uma região C (C-terminal) (SKOBLE et al., 2000). No presente estudo, mutações foram observadas em aminoácidos da região N (aminoácidos 21 a 231) e da região central P (aminoácidos 232 a 393) que desempenham um papel importante na disseminação intra e intercelular, assim como para o processo de agregação e formação de biofilmes (TRAVIER et al., 2013). De acordo com LAUER et al. (2001) mutações em aminoácidos do domínio NH₂-terminal, desta proteína, comprometem a motilidade de *L. monocytogenes*. ROBERTS e WIEDMANN (2006) sugerem que variações nos alelos do gene *actA* podem contribuir para a atenuação da virulência em alguns isolados. Estudos posteriores serão fundamentais para se avaliar o grau de comprometimento da virulência dos isolados em virtude das mutações observadas. Considerando que polimorfismos são encontrados com frequência no gene *actA* é provável que a amplificação deste gene tenha sido dificultada em 18 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos cárneos, em virtude de possíveis mutações nas regiões de pareamento dos *primers*.

O sequenciamento do gene *actA* tem sido realizado como um método de subtipagem, com elevado poder discriminatório, bem como para análise filogenética de *L. monocytogenes* (CAI et al., 2002; BANIA et al., 2009; NALÉRIO, 2009). No presente estudo, verificou-se o agrupamento dos 97 isolados de *L. monocytogenes*, obtidos de salsicha e produtos cárneos crus, em duas linhagens (I e II) previamente descritas na literatura (WIEDMANN et al., 1997; WARD et al., 2004; RAGON et al., 2008), sendo a linhagem I composta pelos isolados do grupo 3 (1/2b e 3b), 4 (4b, 4d e 4e) e atípicos e linhagem II pelos isolados do grupo 1 (1/2a e 3a) e 2 (1/2c e 3c).

É interessante notar o agrupamento dos isolados atípicos na linhagem I. Esses isolados foram identificados como atípicos, pela sorotipagem molecular, devido à presença de dois fragmentos característicos do grupo 4 (ORF2819 e ORF2110) e de um, normalmente, encontrado no grupo 1 e 2 (*Imo0737*). O sequenciamento parcial do gene *Imo0737*, realizado neste estudo, em 20 isolados selecionados entre os 83 obtidos em estudo conduzido por RISTORI et al. (2010) confirmou a presença deste gene nos isolados, e as sequências obtidas apresentaram homologia de 100% entre os isolados avaliados e com sequências disponíveis no GenBank. Diversos estudos mostram que quando submetidos à sorologia convencional, os isolados com este perfil são identificados como sorotipo 4b (CHIARINI et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2008; LEE et al., 2012) e que a presença deste gene neste sorotipo, ocorre por transferência horizontal entre isolados

da linhagem II (1/2a e 1/2c) e I (4b) (LECLERQ et al., 2011; LEE et al., 2012). No presente estudo não foi possível realizar a sorologia convencional destes isolados, no entanto, o agrupamento destes isolados na linhagem I sugere que os mesmos pertencem ao sorotipo 4b.

Com relação à maioria dos isolados do grupo 3 (1/2c e 3c), grupo 4 (4b, 4d e 4e) e atípicos que não foram amplificados com os *primers prfA* descritos por NOTERMANS et al. (1991), embora este gene seja mais conservado quando comparado com o *actA* (ORSI et al., 2008), mutações presentes nos isolados citados podem ter contribuído para o resultado encontrado, uma vez que todos os isolados do grupo 1 (1/2a e 3a) e 2 (1/2b e 3b) foram positivos para gene *prfA* com a utilização destes *primers*.

Além do sequenciamento do gene *actA*, outras técnicas são comumente empregadas para genotipagem de *L. monocytogenes* (NIGHTINGALE et al., 2010). Dentre estas, a eletroforese em campo pulsado (PFGE) é considerada como padrão ouro para subtipagem de micro-organismos (CDC, 2013a).

Neste estudo, 166 isolados foram submetidos à tipagem por PFGE utilizando-se a enzima *Apal* com o objetivo de se avaliar a diversidade genética entre os isolados e para identificar possíveis fontes relacionadas a um determinado perfil. Os isolados de *L. monocytogenes* foram agrupados de acordo com o sorogrupo formando cinco *clusters* com coeficiente de similaridade de 69%. Resultado similar foi observado por SHEN et al. (2013) em que 91 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de produtos cárneos crus e seis de vegetais foram agrupados em três *clusters* com similaridade de 68%.

Além da diferenciação dos isolados de *L. monocytogenes* de acordo com os sorogrupos, os resultados da PFGE mostram a diversidade genética existente entre isolados pertencentes a um mesmo sorogrupo. Isolados com maior variabilidade genética foram observados no sorogrupo 2 (1/c e 3c), sorogrupo 3 (1/2b, 3b e 7) e sorogrupo 4 (4b, 4d e 4e). Os isolados do sorogrupo 2 foram agrupados em dois *clusters* (A e C) distintos com similaridade de 69%, sendo que os isolados presentes no *cluster* A1 apresentaram uma maior relação genética do que aqueles distribuídos no *cluster* A2. A mesma porcentagem de similaridade foi observada entre os isolados do sorogrupo 3 presentes nos *clusters* B e D e sorogrupo 4, encontrados nos *clusters* B e D. Por outro lado, uma menor diversidade foi observada entre os isolados identificados como sorogrupo 1 (1/2a e 3a) e atípicos. Com exceção de um

isolado do sorogrupo 1, presente no *cluster* E, os demais foram agrupados em único *cluster* com similaridade de 85%. Resultado similar foi observado para os isolados atípicos em que a maioria encontra-se em um mesmo *cluster* com coeficiente de similaridade de 85%. Além disso, 77,6% (59/76) dos isolados atípicos apresentaram um único perfil que foi encontrado em todas as categorias de produtos cárneos analisados, coletados em cinco regiões diferentes, indicando que um clone dominante deste sorogrupo está amplamente distribuído nos produtos comercializados no município de São Paulo. Assim como observado na análise filogenética do gene *actA*, os isolados atípicos foram agrupados no mesmo *cluster* contendo isolados do grupo 3 e grupo 4 (linhagem I) reforçando a possibilidade destes isolados pertencerem ao sorotipo 4b.

Dois isolados de *L. monocytogenes*, um identificado como 4a ou 4c (isolado 296) e o outro pertencente ao sorogrupo 1 (1/2a e 3a) (isolado 1176) não foram agrupados com os demais provenientes de produtos cárneos avaliados, sendo agrupados no *cluster* E juntamente com as cepas padrão de *Listeria* spp. O gene *actA* do isolado 1176 foi sequenciado e poucas mutações foram observadas no gene em relação a cepa de referência EGD-e, sendo agrupado com outros isolados pertencentes a linhagem II na análise filogenética. Este isolado apresenta, provavelmente, características genéticas muito distintas dos demais isolados.

O isolado 296 foi considerado como pertencente ao sorogrupo 4a ou 4c pela sorotipagem molecular devido à presença do gene *prs*, presente em todas as espécies de *Listeria*, e ausência dos demais genes que caracterizam os outros sorogrupos de *L. monocytogenes*. Isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4a ou 4c são classificados, geralmente, na linhagem III, o que pode explicar sua presença em um *cluster* distinto dos demais (A, B, C e D) que agruparam isolados pertencentes às linhagem I e II. Há a possibilidade também deste isolado pertencer à outra espécie de *Listeria*. O isolado 296 apresentou 80% de similaridade com a cepa de referência de *L. innocua*, o que sugere que este isolado poderia pertencer a esta espécie. No entanto, segundo CHEN et al. (2009) isolados de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4a apresentam conteúdo genético semelhante ao de *L. innocua*, tornando-os geneticamente relacionados. Ainda de acordo com os autores, a presença de elementos genéticos comumente presentes em *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2a e 4b e a deleção de genes que também estão ausentes em *L. innocua* sugere que isolados do sorotipo 4a

representam uma evolução de *L. monocytogenes* 1/2a e 4b e *L. innocua*. Vale ressaltar que este isolado apresentou todas as características bioquímicas compatíveis com *L. monocytogenes*, bem como todos os genes de virulência pesquisados neste estudo. Uma melhor caracterização deste isolado, incluindo o sequenciamento do gene 16S rRNA, será fundamental para elucidar essa dúvida, uma vez que há relatos de isolados de *L. innocua* com características atípicas, incluindo a presença de genes de virulência, provenientes de alimentos (MORENO et al., 2013).

Não foi possível estabelecer relação entre os perfis obtidos no PFGE com a origem dos isolados ou regiões de coleta. O estudo mostra uma diversidade de isolados de *L. monocytogenes* amplamente distribuídos em diversos tipos de produtos cárneos comercializados em diferentes regiões do município de São Paulo.

A ocorrência de isolados de *L. monocytogenes* com um mesmo perfil em diferentes categorias de produtos cárneos, adquiridos em regiões diversas, indica uma possível origem comum. A característica ubíqua deste micro-organismo favorece sua disseminação e diversos estudos relatam a ocorrência de clones de *L. monocytogenes* em amostras de diferentes origens (FILIOUSIS et al., 2009; MENDONÇA et al., 2012). A ocorrência de isolados provenientes de produtos cárneos adquiridos no comércio e de indústrias apresentando o mesmo pulsotipo tem sido reportada (MENDONÇA et al., 2012; LÓPEZ et al., 2013).

Verificou-se também isolados com um mesmo perfil provenientes de produtos cárneos diferentes coletados em um mesmo supermercado/hipermercado, o que sugere a ocorrência de contaminação cruzada durante a manipulação destes produtos. Em muitos estabelecimentos, diferentes categorias de produtos cárneos (carne moída, salsicha, lingüiça e coxa de frango) são mantidas e manipuladas no mesmo local, favorecendo a contaminação dos mesmos. A higienização inadequada do ambiente e de utensílios, como facas e moedores de carne, aliada a capacidade de *L. monocytogenes* em formar biofilmes e se multiplicar em temperatura de refrigeração contribui para persistência do micro-organismo, levando a constante contaminação dos produtos manipulados naquele local (THÉVENOT; DERNBURG; VERNZOY-ROZAND, 2006).

Neste estudo, não foi evidenciada uma relação entre os perfis obtidos no PFGE e os perfis de resistência antimicrobiana. A maioria dos isolados de *L. monocytogenes* com o mesmo perfil no PFGE apresentaram perfis de resistência

antimicrobiana distintos, corroborando com estudo realizado por ZHANG et al. (2013). De acordo com a LV et al. (2013), a ausência de relação entre o perfil de resistência antimicrobiana e o perfil no PFGE se deve a exclusão de bandas de baixo peso molecular, que correspondem a regiões contendo elementos genéticos que conferem resistência antimicrobiana, durante a análise dos géis. O mesmo foi observado para isolados que apresentaram a deleção de 105 pb no gene *actA*. Em um mesmo perfil foram identificados isolados de *L. monocytogenes* com e sem a deleção.

A resistência antimicrobiana é um tema de grande relevância a saúde pública. Os alimentos, particularmente os de origem animal, destacam-se como uma fonte importante de bactérias resistentes às drogas antimicrobianas bem como de genes de resistência. O uso indiscriminado de antibióticos na produção animal, com fins terapêuticos ou como promotores de crescimento, representa um dos principais fatores associados com a emergência de micro-organismos resistentes que podem ser disseminados aos alimentos em qualquer etapa da cadeia produtiva (VERRAES et al, 2013).

A ocorrência de resistência e multi-resistência em *L. monocytogenes* foi descrita pela primeira vez por POYART-SALMERON et al. (1990) em um isolado, de paciente com meningoencefalite, que apresentou resistência ao cloranfenicol, à eritromicina, estreptomicina e tetraciclina. Desde então, estudos realizados em diversos países mostram um padrão contínuo de emergência de resistência em *L. monocytogenes* isoladas de origem humana e não humana (LUNGU et al., 2011). Embora os índices gerais de resistência para este patógeno sejam considerados baixos, o que se observa, em grande parte dos estudos realizados, é um aumento no número de antibióticos para os quais *L. monocytogenes* tem adquirido resistência (CONTER et al., 2009).

A ocorrência de baixa frequência de isolados resistentes (0,5%), observada no presente estudo, está de acordo com inúmeros estudos realizados em diversos países, incluindo o Brasil. KORSACK et al. (2012), na Polônia, avaliaram 471 isolados de *L. monocytogens* obtidos de alimentos diversos e fontes relacionadas, frente a 13 antimicrobianos, e apenas dois isolados (0,42%) foram resistentes, sendo um deles à tetraciclina (16 µg/ mL) e minociclina (4 µg/ mL) e o outro à ciprofloxacina (8-12 µg/ mL) e norfloxacina (32-48 µg/ mL).

Na Espanha, VITAS et al. (2007) verificaram que somente cinco (1,2%) isolados, dentre os 440 avaliados (401 provenientes de alimentos e 39 de origem clínica), apresentaram resistência a tetraciclina (MIC 32 µg/ mL) e doxiciclina (16 µg/ mL). Na França, GRANIER et al. (2011) avaliaram 202 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de amostras de alimentos e ambiente, coletadas no período de 1996 a 2006, e apenas quatro (2%) isolados (três de origem ambiental) apresentaram perfil de resistência, sendo dois para eritromicina (MIC >4 µg/ mL), um para tetraciclina (MIC >8 µg/ mL) e um para tetraciclina (MIC >8 µg/ mL) e trimetoprim (MIC >2 µg/ mL).

A avaliação do perfil de susceptibilidade de 4.668 isolados de *L. monocytogenes* de origem clínica, por MORVAN et al. (2010), frente a 23 drogas antimicrobianas, revelou que 61 (1,27%) isolados foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano de importância clínica, sendo que a maioria apresentou resistência a tetraciclina (MIC 16-128 µg/ mL) e ciprofloxacina (6-32 µg/ mL).

No Brasil, REIS et al. (2011) verificaram que três (4,4%) entre os 68 isolados de origem humana avaliados, apresentaram resistência, um a rifamicina e dois ao trimetoprim-sulfametoxazol. LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO (2007) observaram que dois (15,4%), dentre os treze isolados de casos clínicos, apresentaram resistência ao sulfametoxazol. Em isolados de origem não humana, resistência antimicrobiana não foi observada em isolados provenientes de abatedouros de bovinos (SILVEIRA, 2010), suínos (FERRONATO, 2010) e de produtos lácteos (NES et al., 2010).

Por outro lado, índices mais elevados de resistência têm sido observados, especialmente, em isolados de origem não humana. WONG et al. (2012) verificaram que 68,2% dos 41 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de hambúrgueres apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico, além de detectarem multi-resistência (mais de dois antibióticos) em 48,7% dos isolados. As maiores taxas de resistência foram observadas para tetraciclina (46,3%), eritromicina (36,6%) e amicacina (31,7%). Em estudo conduzido por da ROCHA et al. (2012) com 44 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos cárneos, 34,1% foram resistentes às drogas antimicrobianas testadas, sendo resistência a tetraciclina o fenótipo mais comum (27,1%).

Com relação aos antibióticos avaliados neste estudo, os β-lactâmicos (penicilina ou ampicilina) associados ou não com a gentamicina são utilizados,

normalmente, como antibióticos de primeira escolha para tratamento de pacientes com listeriose. Em pacientes alérgicos às penicilinas pode ser administrada a vancomicina ou o trimetoprim/sulfametoxazol (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). A emergência de resistência a estes antibióticos pode representar um risco para a população. No entanto, os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos cárneos, avaliados no presente estudo, apresentaram 99,1% a 100% de susceptibilidade a estes antimicrobianos, demonstrando a alta eficácia dos mesmos contra este patógeno.

A elevada susceptibilidade observada para ampicilina, gentamicina e vancomicina tem sido reportada em isolados de *L. monocytogenes* de origens diversas (CHIARIANI, 2007; REIS et al., 2011; KORSACK et al., 2012; OSAILI et al., 2012; KOVACEVIC et al., 2013; HASEGAWA et al., 2013; LV et al., 2013).

A ocorrência de resistência intermediária em apenas três isolados (0,7%) frente ao trimetoprim-sulfametoxazol, além do baixo valor do MIC₉₀ (0,06/1,18 µg/mL) apresentado para esta associação de antibióticos, está de acordo com outros estudos que relatam uma baixa frequência de resistência a estas drogas (CONTER et al., 2009; LYON et al., 2008; WIECZOREK et al., 2012).

Até o momento, a maioria dos estudos referem 100% susceptibilidade (CONTER et al., 2009; DAVIS; JACKSON, 2009; SAKARIDIS et al., 2011; da ROCHA et al., 2012) ou baixa frequência de resistência à penicilina em *L. monocytogenes* (YAN et al., 2010; WONG et al., 2012; DERRA et al., 2013), assim como observado no presente estudo (0,2%). No entanto, índices mais elevados de resistência, a este antibiótico, já foram descritos em isolados de produtos cárneos crus (22,2%) (RAHIMI et al., 2012), leite cru (43,4%) (JAMALI et al., 2013) e em carne moída de peru (80,8%) (AYAZ; EROL, 2010).

A ocorrência de taxas de resistência mais elevadas, bem como o aumento nos valores de MIC para penicilina, reforçam a importância do constante monitoramento do perfil de resistência a esta droga entre isolados de *L. monocytogenes*. MORVAN et al. (2010) avaliaram a evolução dos valores do MIC para penicilina, em isolados de origem clínica obtidos no período de 1926 a 2007, e verificaram aumento significativo nestes valores nos últimos anos. Apesar de todos os 436 isolados apresentarem susceptibilidade à penicilina por Etest, os autores verificaram que os valores de MIC para isolados obtidos a partir de 1989 foram

superiores (0,125-2 µg/ mL) aos valores apresentados pelos isolados obtidos até o ano de 1988 (0,023-1 µg/ mL).

Vale ressaltar que, no presente estudo, apenas um isolado apresentou MIC de 4 µg/ mL (resistência) e que o valor do MIC₉₀ calculado para este antibiótico (0,5 µg/ mL) foi similar ao observado por VITAS et al. (2007) em *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e amostras clínicas e inferior ao observado por MORVAN et al. (2010) em isolados clínicos (0,75-1 µg/ mL) e RUIZ-BOLIVAR et al. (2011) em isolados de alimentos (4 µg/ mL), demonstrando a elevada susceptibilidade observada para este antibiótico neste estudo.

O fenótipo de resistência à tetraciclina está entre os mais comumente descritos em *L. monocytogenes* (LUNGU et al., 2011) e uma ampla variação nos índices de resistência tem sido descrita (DAVIS; JACKSON ET AL., 2009; KORSACK et al., 2012; GRANIER et al., 2011; WONG et al., 2012; da ROCHA et al., 2012). A resistência à tetraciclina é mediada pela produção de proteínas que conferem proteção ao ribossomo, codificadas genes *tet(M)*, *tet(O)* ou *tet(S)* ou por bombas de efluxo, codificadas pelos genes *tet(K)* e *tet(L)*, que removem níveis tóxicos da droga da parede celular. Em *L. monocytogenes*, a resistência a este antibiótico está associada, geralmente, com a presença do gene *tet(M)* ou, com menos frequência, ao gene *tet(S)* (YAN et al., 2010; GRANIER et al., 2011; KORSACK ET AL., 2012). O gene *tet(M)* é carregado, frequentemente, por elementos genéticos móveis, como os transposons conjugativos da família Tn916-1545 comumente encontrados em *Enterococcus* spp. e que podem ser transferidos entre as diferentes espécies de bactérias Gram positivas, incluindo *Listeria* spp.

Testes realizados *in vitro* ou em matrizes alimentares demonstraram a transferência do gene *tet(M)* entre diferentes espécies de *Enterococcus* e *L. innocua* (RIZZOTTI et al., 2009), entre *L. monocytogenes* e *Enterococcus faecalis* (BERTSCH et al., 2013), entre bactérias ácido lácticas e *Listeria* spp. (TOOMEY et al, 2009) e entre *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* e *E. faecalis* (POURSHABAN et al., 2002).

Considerado que *Enterococcus* spp. é uma fonte comum de genes de resistência à tetraciclina e que estudos realizados no Brasil, particularmente no estado de São Paulo, relatam uma elevada frequência de isolados de enterococos resistentes a este antibiótico em alimentos, incluindo frango (87%) (RISTORI et al., 2013) e outros produtos de origem animal e vegetal (37,5%) (GOMES et al., 2008), a

ocorrência de apenas um isolado, proveniente de coxa de frango, com perfil de resistência a tetraciclina no presente estudo sugere que os eventos de transferência de genes entre *L. monocytogenes* e enterococos são, provavelmente, pouco frequentes.

Com relação à clindamicina, apenas um isolado apresentou resistência a este antibiótico. No entanto, verificou-se elevado índice de resistência intermediária (69,2%) a este antimicrobiano, sendo este o fenótipo mais frequente entre os isolados (Tabela 10). Resistência e/ou resistência intermediária à clindamicina são comumente descritos na literatura. Em estudo conduzido por WIECZOREC et al. (2012), resistência e resistência intermediária à clindamicina foram observadas em 37% e 53,7%, respectivamente, dos 54 isolados de *L. monocytogenes* obtidos de couro e carcaças de bovinos. A avaliação do perfil de susceptibilidade de 259 isolados, provenientes de carne e derivados de origem suína e do ambiente de processamento destes produtos, por GAMBOA-MARÍN et al. (2013), mostrou que 36,7% e 39,8% dos isolados apresentaram resistência e resistência intermediária, respectivamente. Os valores de MIC₅₀ (2 µg/ mL) e MIC₉₀ (4 µg/ mL), observados pelos autores, foram superiores aos do presente estudo (1 µg/ mL e 2 µg/ mL, respectivamente). CHIARINI (2007) e SAKARIDIS (2011) verificaram elevadas taxas de resistência à clindamicina em isolados provenientes de abatedouros de frango, 60,5% e 83,6%, respectivamente. Um índice mais elevado (96,2%) foi verificado por SAFDAR; ARMSTRONG (2003) em isolados de origem humana.

Entre os nove perfis de resistência descritos para *L. monocytogenes* neste estudo (Tabela 10), a clindamicina esteve presente em oito, sendo um perfil representado unicamente pela clindamicina e os demais por clindamicina juntamente com outros antibióticos. A clindamicina apresenta um mecanismo de ação similar ao da eritromicina e do cloranfenicol, inibindo a síntese proteica por meio de sua ligação a subunidade 50S do ribossomo, podendo ocorrer resistência cruzada entre esses três antibióticos (DEPARDIEU et al., 2007). Esta particularidade poderia explicar alguns dos perfis observados no presente estudo (Tabela 10). No entanto, relatos de altos índices de resistência ou resistência intermediária exclusivamente a clindamicina, como descrito neste estudo, sugerem que outros mecanismos de resistência, como a produção de enzimas que inativam o antimicrobiano poderiam estar envolvidos (CHEN et al., 2010; RUIZ-BOLIVAR et al., 2011).

Diminuição na susceptibilidade à ciprofloxacina tem sido descrita entre isolados de *L. monocytogenes* (CHAO et al., 2007; KOVACEVIC; MESAK; ALLEN, 2012), como observado no presente estudo em que 22,4% dos isolados apresentaram resistência intermediária a este antibiótico. Assim como a clindamicina, a ciprofloxacina esteve presente na maioria dos perfis observados para *L. monocytogenes* (Tabela 10). A ocorrência concomitante de resistência intermediária a clindamicina e ciprofloxacina pode estar relacionada a um fenômeno de co-seleção. Em um estudo recente, KOVACEVIC et al. (2013) verificaram que isolados com susceptibilidade reduzida a clindamicina quando expostos a uma alta concentração de ciprofloxacina apresentavam um aumento nos valores do MIC, tornando-se resistentes a clindamicina. Entretanto, os fatores que levaram a esse resultado não foram elucidados. A resistência a ciprofloxacina é mediada, geralmente, por bombas de efluxo codificadas pelo gene *lde*. Este gene está presente também em isolados sensíveis a ciprofloxacina, o que sugere que a resistência estaria associada a uma elevada expressão do gene (JIANG et al., 2012).

Com relação aos sorogrupos de *L. monocytogenes* avaliados neste estudo, considerando-se os fenótipos de resistência e resistência intermediária, as maiores taxas foram observadas para isolados do grupo 2 (1/2c e 3c) (94,2%) e grupo 1 (1/2a e 3a) (82,7%), assim como reportado por AYAZ; EROL (2010) em isolados provenientes de carne de peru moída. GAMBOA-MARÍN et al. (2013) também detectaram fenótipos de resistência mais complexos (resistência a cinco antimicrobianos) em isolados dos sorotipos 1/2a (3a) e 1/2c (3c) de origem suína.

Quanto à origem dos isolados, a menor ocorrência de resistência intermediária, observada neste estudo, em isolados obtidos de salsicha está relacionada, provavelmente, com a distribuição dos sorogrupos em cada produto. As amostras de carne moída, coxa de frango e linguiça eram constituídas em sua maioria (69%, 82% e 74%, respectivamente) por isolados dos grupos 1 (1/2a e 3a), 2 (1/2c e 3c) e atípicas (Tabela 2), que apresentaram as maiores taxas de resistência intermediária conforme Figura 3, enquanto que em salsicha aproximadamente 43% dos isolados pertenciam a estes sorogrupos. Esse resultado mostra a diversidade de produtos que podem apresentar isolados com perfil de resistência. Os inúmeros estudos realizados com isolados de fontes diversas, citados na presente pesquisa, confirmam essa ampla distribuição.

No presente estudo foi observada baixa frequência de resistência antimicrobiana entre os isolados de *L. monocytogenes*. No entanto, considerando o potencial patogênico e a alta taxa de mortalidade deste patógeno é de fundamental importância o constante monitoramento do perfil de resistência deste micro-organismo, principalmente, entre os isolados provenientes de produtos de origem animal.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo, é possível concluir que:

- Os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus, comercializados no município de São Paulo, apresentam uma baixa frequência de resistência antimicrobiana aos antibióticos testados;
- Os genes de virulência *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *actA*, *mpl*, *iap*, *plcB*, *plcA* e *hly* apresentam ampla distribuição entre os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus, demonstrando o potencial de virulência destes isolados;
- A diversidade genética observada entre os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de salsicha e produtos cárneos crus se deve, provavelmente, a característica ubíqua deste micro-organismo, tornando-o mais susceptível a grande pressão seletiva do ambiente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABACHIN, E.; POYART, C.; PELLEGRINI, E.; MILOHANIC, E.; FIEDLER, F.; BERCHE, P.; TRIEU-CUOT, P. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.43, n.1, p.1-14, 2002.

ADZITEY, F.; HUDA, N.; ALI, G.R. Prevalence and antibiotic resistance of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *L. monocytogenes* in ducks: a review. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, n.6, p.498-505, 2012.

ALVAREZ-DOMINGUEZ, C.; ROBERTS, R.; STAHL, P.D. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. **Journal of Cell Science**, v.110 (Pt 6), p. 731-743, 1997.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ARAGON, D.C.; MARTINEZ, E.Z.; LANDGRAF, M.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. **Food Control**, v.19, n.5, p.483-486, 2008.

ARAÚJO, M.R.; CERQUEIRA, G.M.; NALÉRIO, E.S.; MENDONÇA, K.S.; MOREIRA, A.N.; DELLAGOSTIN, O.A.; SILVA, W.P. **Diversidade genética de *Listeria monocytogenes* na cadeia de frangos do sul do Rio Grande do Sul avaliada através de sequenciamento parcial do gene *actA***. In: 25º Congresso de Microbiologia. 2011. Foz de Iguaçu. Disponível em: <http://sbmicrobiologia.org.br/pdf/cdsbm/resumos/R2527-2.html>. Acesso em: set 2012.

AYAZ, N.D., EROL, I. Relation between serotype distribution and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ground turkey. **Journal of Food Protection**, v.73, n.5, p.967-972, 2010.

BALANDYTÉ, L.; BRODARD, I.; FREY, J.; OEVERMANN, A.; ABRIL, C. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* alleles linked to a multilocus variable-number tandem-repeat analysis complex. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.23, p. 8325-8335, 2011.

BANIA, J.; ZARCZYŃSKA, A.; MOLEND, J.; DABROWSKA, A.; KOSEK-PASZKOWSKA, K.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; RÓZALSKA, B. Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates by *actA* gene sequencing, PCR-fingerprinting, and cell-invasion assay. **Folia Microbiologica**, v.54, n.1, p.17-24, 2009.

BARANCELLI, G.V.; CAMARGO, T.M.; REIS, C.M.; PORTO, E.; HOFER, E.; OLIVEIRA, C.A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.74, n.5, p.816-819, 2011.

BARBOSA, A.V.; VALLIM, D.C.; CERQUEIRA, A.M.F.; REIS, C.M.F.; RUSAK, L.A.; HOFER, E. **Ocorrência e diversidade de clones epidêmicos de *Listeria monocytogenes* sorotipo 4b no Brasil.** In: XVI Encontro Científico do Instituto Biomédico. V Jornada Científica da Biomedicina. IV Workshop de Microbiologia. 2012. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.uff.br/ecib/2012/?q=content/ocorrencia-e-diversidade-de-clones-epidemicos-de-listeria-monocytogenes-sorotipo-4b-no>. Acesso: out 2012.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, n.4, p.591-596, 2007.

BERTSCH, D.; ANDEREGG, J.; LACROIX, C.; MEILE, L.; STEVENS, MJ. pDB2011, a 7.6kb multidrug resistance plasmid from *Listeria innocua* replicating in Gram-positive and Gram-negative hosts. **Plasmid**, v.70, n.2, p.284-287, 2013.

BIAVASCO, F.; GIOVANETTI, E.; MIELE, A.; VIGNAROLI, C.; FACINELLI, B.; VARALDO, P.E. In vitro conjugative transfer of VanA vancomycin resistance between *Enterococci* and *Listeriae* of different species. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, n.1, p.50-59, 1996.

BIERHOFF, M.; KRUTWAGEN, E.; VAN BOMMEL, E.F.; VERBURGH, C.A. *Listeria* peritonitis in patients on peritoneal dialysis: two cases and a review of the literature. **The Netherlands Journal of Medicine**, v.69, n.10, p.461-464, 2011.

BONAZZI, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. **Cell Microbiology**, v.11, n.5, p.693-702, 2009.

BRITO, J.R.; SANTOS, E.M.; ARCURI, E.F.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.; SOUZA, G.N.; CERQUEIRA, M.M.; BELTRAN, J.M.; CALL, J.E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A.C.; LUCHANSKY, J.B. Retail survey of Brazilian milk and Minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.15, p.4954-4961, 2008.

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

BROUWER, M.C.; VAN DE BEEK, D.; HECKENBERG, S.G.; SPANJAARD, L.; DE GANS, J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, n.10, 1233-1238, 2006.

BUENO, V.F.; BANERJEE, P.; BANADA, P.P.; JOSÉ DE MESQUITA, A.; LEMES-MARQUES, E.G.; BHUNIA, AK. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, v.20, n.1, p.43-59, 2010.

CAI, S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y.; CARGIOLI, T.G.; CHUNG, M.S.; NIELSEN, R.; WIEDMANN, M. Rational design of DNA sequence-based strategies for subtyping *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.9, p.3319-3325, 2002.

CAMEJO, A.; CARVALHO, F.; REIS, O.; LEITÃO, E.; SOUSA, S.; CABANES, D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, v.2, n.5, p.379-394, 2011.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n1, p.1-8, 2011.

CARTWRIGHT, E.J.; JACKSON, K.A.; JOHNSON, S.D.; GRAVES, L.M.; SILK, B.J.; MAHON, B.E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, n.1, p.1-9, 2013.

CEBALLOS, B.S.; SOARES, N.E.; MORAES, M.R.; CATÃO, R.M.; KONIG, A. Microbiological aspects of an urban river used for unrestricted irrigation in the semi-arid region of north-east Brazil. **Water Science and Technology**, v.47, n.3, p.51-57, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe--United States, August-September 2011. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n.39, p.1357-1358, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Enteric Disease Surveillance. Listeria annual summary, 2010**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/pdf/listeria-annual-summary-2010-508c.pdf>. Acesso: out 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vital Signs: *Listeria* Illnesses, Deaths, and Outbreaks — United States, 2009–2011. **Morbidity and Mortality weekly Report**, v.62, n.22, p.448-452, 2013b.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Listeria monocytogenes* (2013a). Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>. Acesso: jul 2013.

CHAKRABORTY, T.; EBEL, F.; WEHLAND, J.; DUFRENNE, J.; NOTERMANS, S. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.10, n.1, p.1-9, 1994.

CHAO, G.; ZHOU, X.; JIAO, X.; QIAN, X.; XU, L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.4, n.3, p.277-84, 2007.

CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Conjugative mobilization of the rolling-circle plasmid pIP823 from *Listeria monocytogenes* BM4293 among gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.11, p.3368-3374, 1999.

CHEN, B.Y.; PYLA, R.; KIM, T.J.; SILVA, J.L.; JUNG, Y.S. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, n.6, 626-632, 2010.

CHEN, J.; JIANG, L.; CHEN, X.; LUO, X.; CHEN, Y.; YU, Y.; TIAN, G.; LIU, D.; FANG, W. *Listeria monocytogenes* serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between *L. monocytogenes* serovars 1/2a and 4b and *L. innocua*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.3, p.238-249, 2009.

CHEN, J.; JIANG, L.; CHEN, X.; LUO, X.; CHEN, Y.; YU, Y.; TIAN, G.; LIU, D.; FANG, W. *Listeria monocytogenes* serovar 4a is a possible evolutionary intermediate between *L. monocytogenes* serovars 1/2a and 4b and *L. innocua*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.3, p.238-249, 2009.

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

CHIARINI E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. 2007.149p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

CHIARINI, E.; TYLER, K.; FARBER, J.M.; PAGOTTO, F.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. **Poultry Science**, v.88, n.4, p.791-797, 2009.

CHICO-CALERO, I.; SUÁREZ, M.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; SCORTTI, M.; SLAGHUIS, J.; GOEBEL, W.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. European *Listeria* Genome Consortium. **Proceedings of**

National Academy of Science of United States of America, v.99, n.1, p.431-436, 2002.

CLARK, C.G.; FARBER, J.; PAGOTTO, F.; CIAMPA, N.; DORÉ, K.; NADON, C.; BERNARD, K.; NG, L.K.; CPHLN. Surveillance for *Listeria monocytogenes* and listeriosis, 1995-2004. **Epidemiology and Infection**, v.138, n.4, p.559-572, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for Antimicrobial Dilutions and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Aproved Guidiline (M45-A)**, v.26, n.19, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Twenty first Informational Supplement (M100-S21), v. 31, n. 1, 2011.

CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, n.3, p.497-500, 2009.

CONTER, M.; VERGARA, A.; DI CICCIO, P.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Polymorphism of *actA* gene is not related to in vitro virulence of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.1, p.100-105, 2010.

CRUZ, CRISTINA DURANTE. **Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*, pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimento, do ambiente de processamento e de amostra clínica**. 2007. 170p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

da ROCHA, L.S.; GUNATHILAKA, G.U.; ZHANG, Y. Antimicrobial-resistant *Listeria* species from retail meat in metro Detroit. **Journal of Food Protection**, v.75, n.12, p.2136-2141, 2012.

D'AGOSTINO, M.; WAGNER, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUCHTA, T.; KARPISKOVA, R.; HOORFAR, J.; NOVELLA, S.; SCORTTI, M.; ELLISON, J.; MURRAY, A.; FERNANDES, I.; KUHN, M.; PAZLAROVA, J.; HEUVELINK, A.; COOK, N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model--towards an international standard. **Journal of Food Protection**, v.67, n8, p.1646-1655, 2004.

DAVIS, J.A.; JACKSON, C.R. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. **Microbial Drug Resistance**, v.15, n.1, p.27-32, 2009.

DENNY, J.; MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe--an opportunity for improved European surveillance. **Euro Surveillance**, v.13, n.13, p. 8082, 2008.

DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E.; COURVALIN, P. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, 79-114, 2007.

DERRA, F.A.; KARLSMOSE, S.; MONGA, D.P.; MACHE, A.; SVENDSEN, C.A.; FÉLIX, B.; GRANIER, S.A.; GEYID, A.; TAYE, G.; HENDRIKSEN, R.S. Occurrence of *Listeria* spp. in retail meat and dairy products in the area of Addis Ababa, Ethiopia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.10, n.6, p.577-579, 2013.

DIAS, V.; CABRAL, S.; ANJO, D.; VIEIRA, M.; ANTUNES, N.; CARVALHEIRAS, G.; GOMES, C.; MEIRELES, A.; MENDONÇA, T.; TORRES, S. Successful management of *Listeria monocytogenes* pericarditis: case report and review of the literature. **Acta Cardiology**, v.66, n.4, p.537-538, 2011.

DISSON, O.; LECUIT, M. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v.3, n.2, p. 213-221, 2012.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.35, n.3, p.173-175, 2003.

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3819-3822, 2004a.

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. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.1072-1083, 2004b.

DRAMSI, S.; BOURDICHON, F.; CABANES, D.; LECUIT, M.; FSIHI, H.; COSSART, P.; FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. **Molecular Microbiology**, v.53, n.2, 639-649, 2004.

DREVETS, D.A.; BRONZE, M.S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.53, n.2, p.151-165, 2008.

DUODU, S.; HOLST-JENSEN, A.; SKJERDAL, T.; CAPPELIER, J.M.; PILET, M.F.; LONCAREVIC, S. Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.795-801, 2010.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. **The EFSA Journal**, v.765, p.1-87, 2008.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **The EFSA Journal**, v.10, n.3, p.2593 – 3039, 2012.

FERRONATO, A.I. **Contaminação de caracças e ambiente por *Listeria* sp. em diferentes etapas do abate de suínos**. 2010. 65p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

FILIOUSIS, G.; JOHANSSON, A.; FREY, J.; PERRETEEN, V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v.20, n.3, p.314-317, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Judicious use of antimicrobials for swine veterinarians**. 2005 Disponível em: www.fda.gov/cvm/Documents/JUSWINE.pdf Acesso em: out 2012.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. 2004. Microbiological risk assessment series no. 4. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf>. Acesso em: out 2012.

FOX, E.M.; LEONARD, N.; JORDAN, K. Molecular diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from Irish dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.5, p.635-641, 2011.

FRANCIOSA, G.; MAUGLIANI, A.; FLORIDI, F.; AURELI, P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, n.3, p.431-439, 2005.

FURRER, B.; CANDRIAN, U.; HOEFELEIN, C.; LUETHY, J. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, n.5, 372–379, 1991.

GALVÃO, N.N.; CHIARINI, E.; DESTRO, M.T.; DE AGUIAR FERREIRA, M.; NERO, L.A. PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. **Meat Science**, v.92, n.4, p.635-643, 2012.

GAMBOA-MARÍN, A.; MEJÍA-WAGNER, D.C.; MORENO-OCAMPO, P.A.; BUITRAGO, S.M.; PÉREZ-PÉREZ, K.I.; RUIZ-BOLIVAR, Z.; POUTOU-PIÑALES, R.A.; CARRASCAL-CAMACHO, A.K.; VELASCO-BRICEÑO, A.; OCAMPO-GUERRERO, M.L. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. **Journal of Swine Health Production**, v. 21, n.1, p.10–21, 2013.

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

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; BEKAL, S. Widespread listeriosis outbreak attributable to pasteurized cheese, which led to extensive cross-contamination affecting cheese retailers, Quebec, Canada, 2008. **Journal of Food Protection**, v.75, n1, p.71-78, 2012.

GEESE, M.; LOUREIRO, J.J.; BEAR, J.E.; WEHLAND, J.; GERTLER, F.B.; SECHI, A.S. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. **Molecular Biology of the Cell**, v.13, n.7, p. 2383-2396, 2002.

GERNER-SMIDT, P.; HISE, K.; KINCAID, J.; HUNTER, S.; ROLANDO, S.; HYYTIÄ-TREES, E.; RIBOT, E.M.; SWAMINATHAN, B. PulseNet Taskforce. PulseNet USA: a five-year update. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p.9-19, 2006.

GILBERT, R.J. Cholesterol-dependent cytolysins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.677, n, p.56-66, 2010.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.; DARINI, A.L.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.; DE MARTINIS, E.C. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v.25, n.5, p.668-675, 2008.

GOULET, V.; KING, L.A.; VAILLANT, V.; DE VALK, H. What is the incubation period for listeriosis? **BMC Infect Dis**, v.13, n.11, p.1-7, 2013.

GRANIER, S.A.; MOUBARECK, C.; COLANERI, C.; LEMIRE, A.; ROUSSEL, S.; DAO, T.T.; COURVALIN, P.; BRISABOIS, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.8, p.2788-2790, 2011.

GRAVES, L.M.; HELSEL, L.O.; STEIGERWAL, T.A.G.; MOREY, R.E.; DANESHVAR, M.I.; ROOF, S.E.; ORSI, R.H.; FORTES, E.D.; MILILLO, S.R.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60 (Pt 6), p. 1280-1288, 2010.

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

GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; REEVES, M.W.; HUNTER, S.B.; WEAVER, R.E.; PLIKAYTIS, B.D.; SCHUCHAT, A. Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.12, p.2936–2943, 1994.

GRIF, K; PATSCHEIDER, G.; DIERICH, MP.; ALLERBERGER, F. Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, n.1, p.16–20, 2003.

HAIN, T.; GHAI, R.; BILLION, A.; KUENNE, C.T.; STEINWEG, C.; IZAR, B.; MOHAMED, W.; MRAHEIL, M.A.; DOMANN, E.; SCHAFFRATH, S.; KÄRST, U.; GOESMANN, A.; OEHM, S.; PÜHLER, A.; MERKL, R.; VORWERK, S.; GLASER, P.; GARRIDO, P.; RUSNIOK, C.; BUCHRIESER, C.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. **BMC Genomics**, v.13, n.144, p.2-17, 2012.

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

HASEGAWA, M.; IWABUCHI, E.; YAMAMOTO, S.; ESAKI, H.; KOBAYASHI, K.; ITO M.; HIRAI, K.; Prevalence and characteristics of *Listeria monocytogenes* in bovine colostrum in Japan. **Journal of Food Protection**, v.76, n.2, p.248-255, 2013.

HELLSTRÖM, S.; LAUKKANEN, R.; SIEKKINEN, K.M.; RANTA, J.; MAIJALA, R.; KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination in pork can originate from farms. **Journal of Food Protection**, v.73, n.4, p.641-648, 2010.

HODŽIĆ, S.; HUKIĆ, M.; FRANCIOSA, G.; AURELI, P. The pathogenic potential of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food in Northeast Bosnia and Herzegovina. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.11, n.9, p.1279-1283, 2011.

HOELZER, K.; POUILLOT, R.; DENNIS, S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. **Veterinary Research**, v.43, n.18, p.1-27, 2012.

HOFER, C.B.; MELLES, C.E.A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, p.375-377, 1999.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. *Listeria monocytogenes* meningitis: case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

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

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.5, p.615-620, 2000.

HOFFMANN, S.; BATZ, M.B.; MORRIS, J.G. JR. Annual cost of illness and quality-adjusted life year losses in the United States due to 14 foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v.75, n.7, p.1292-1302, 2012.

HUANG, Y.T.; LIAO, C.H.; YANG, C.J.; TENG, L.J.; WANG, J.T.; HSUEH, P.R. Listeriosis, Taiwan, 1996-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.9, p.1731-1733, 2011.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-1: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes***. Part 1: Detection method: modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. Switzerland: ISO, 2004. 16p

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11290-2:1998: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes***. Part 2: Enumeration method. Switzerland: ISO, 1998. 19p.

IVY, R.A.; CHAN, Y.C.; BOWEN, B.M.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Growth temperature-dependent contributions of response regulators, σ B, PrfA, and motility factors to *Listeria monocytogenes* invasion of Caco-2 cells. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.11, p. 1337-1349, 2010.

JACKSON, K.A.; BIGGERSTAFF, M.; TOBIN-D'ANGELO, M.; SWEAT, D.; KLOS, R.; NOSARI, J.; GARRISON, O.; BOOTHE, E.; SAATHOFF-HUBER, L.; HAINSTOCK, L.; FAGAN, R.P. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. **Journal of Food Protection**, v.74, n.6, 949-953, 2011.

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

JAGADEESAN, B.; KOO, O.K.; KIM, K.P.; BURKHOLDER, K.M.; MISHRA, K.K.; AROONNUAL, A.; BHUNIA, A.K. LAP, an alcohol acetaldehyde dehydrogenase enzyme in *Listeria*, promotes bacterial adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells only in pathogenic species. **Microbiology**, v.156, p.2782-2795, 2010.

JAMALI, H.; RADMEHR, B. Frequency, virulence genes and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. isolated from bovine clinical mastitis. **Veterinary Journal**, S1090-0233(13)00296-7, 2013

JARADAT, Z.W.; SCHUTZE, G.E.; BHUNIA, A.K. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, n.1-2, p.1-2, 2002.

JEFFERS, G.T.; BRUCE, J.L.; MCDONOUGH, P.L.; SCARLETT, J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, v.147, p.1095-1104, 2001.

JIANG, X.; ZHOU, L.; GAO, D.; WANG, Y.; WANG, D.; ZHANG, Z.; CHEN, M.; SU, Y.; LI, L.; YAN, H.; SHI, L. Expression of efflux pump gene *lde* in ciprofloxacin-resistant foodborne isolates of *Listeria monocytogenes*. **Microbiology and Immunology**, v.56, n.12, p.843-846, 2012.

KAUR, S.; MALIK, S.V.; VAIDYA, V.M.; BARBUDDHE, S.B. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.5, p. 1889-1896, 2007.

KEENEY, K.M.; STUCKEY, J.A.; O'RIORDAN, M.X. LplA1-dependent utilization of host lipoyl peptides enables *Listeria* cytosolic growth and virulence. **Molecular Microbiology**, v.66, n.3, p.758-770, 2007.

KEROUANTON, A.; ROCHE, S.M.; MARAULT, M.; VELGE, P.; POURCHER, A.M.; BRISABOIS, A.; FEDERIGHI, M.; GARREC, N. Characterization of isolates of *Listeria monocytogenes* from sludge using pulsed-field gel electrophoresis and virulence assays. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.4, p.1380-1388, 2010.

KIRCHNER, M.; HIGGINS, D.E. Inhibition of ROCK activity allows InlF-mediated invasion and increased virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.68, n.3, p.749-767, 2008.

KOCH, J.; DWORAK, R.; PRAGER, R.; BECKER, B.; BROCKMANN, S.; WICKE, A.; WICHMANN-SCHAUER, H.; HOF, H.; WERBER, D.; STARK, K. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.12, p.1581-1584, 2010.

KORSAK, D.; BOREK, A.; DANILUK, S.; GRABOWSKA, A.; PAPPELBAUM, K. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and food processing environment in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, v.158, n.3, p.203-208, 2012.

KOVAČEVIĆ J, SAGERT J, WOZNIAK A, GILMOUR MW, ALLEN KJ. Antimicrobial resistance and co-selection phenomenon in *Listeria* spp. recovered from food and food production environments. **Food Microbiology**, v.34, n.2, p.319-327, 2013.

KOVAČEVIĆ, J.; MESAK, L.R.; ALLEN, K.J. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. **Food Microbiology**, v.30, n.2, p.372-378, 2012.

KUHN, M; GOEBEL, W. Molecular virulence determinants in *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. **Listeria, Listeriose and Food Safety**. 3ed. New York: CRC Press, 2007, cap.5, p.111-156.

LAMONT, R.F.; SOBEL, J.; MAZAKI-TOVI, S.; KUSANOVIC, J.P.; VAISBUCH, E.; KIM, S.K.; ULDBJERG, N.; ROMERO, R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. **Journal of Perinatal Medicine**, v.39, n.3, p.227-236, 2011.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LANG HALTER, E.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* of a German fresh water pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63 (Pt 2), p. 641-647, 2012.

LAUER, P.; THERIOT, J.A.; SKOBLE, J.; WELCH, M.D.; PORTNOY, D.A. Systematic mutational analysis of the amino-terminal domain of the *Listeria monocytogenes* ActA protein reveals novel functions in actin-based motility. **Molecular Microbiology**, v.42, n.5, p.1163-1177, 2001.

LECLERCQ, A.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; DIEYE, H.; CANTINELLI, T.; DRALI, R.; BRISSE, S.; LECUIT, M. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. **International Journal of Food Microbiology**, v.147, n.1, p.74-77, 2011.

LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.A.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S.M.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60 (Pt9), p.2210-2214, 2010.

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

LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical Microbiology and Infection**, v.11, n.6, p.430-436, 2005.

LEE, S.; WARD, T.J.; GRAVES, L.M.; WOLF, L.A.; SPERRY, K.; SILETZKY, R.M.; KATHARIOU, S. Atypical *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains harboring a lineage II-specific gene cassette. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.3, p.660-667, 2012.

LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is coordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.5, n.2, p.361–366, 1991.

LEMES–MARQUES, E. G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno– and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.195-206, 2007.

LEUNG, N.; GIANFELICE, A.; GRAY-OWEN, S.D.; IRETON, K. Impact of the *Listeria monocytogenes* protein InlC on infection in mice. **Infection and Immunity**, v.81, n.4, p.1334-1340, 2013.

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

LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, n.2, p.101-115, 2007a.

LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AUSTIN, F.W.; AINSWORTH, A.J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, n.2, p.133-140, 2007b.

LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; GORSKI, L.; MANDRELL, R.E.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.1, p. 214-217, 2006.

LOMONACO, S.; CHEN, Y.; KNABEL, S.J. Analysis of additional virulence genes and virulence gene regions in *Listeria monocytogenes* confirms the epidemiologic relevance of multi-virulence-locus sequence typing. **Journal of Food Protection**, v.71, n.12, p.2559-2566, 2008.

LOMONACO, S.; PATTI, R.; KNABEL, S.J.; CIVERA, T. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, n.1, p.76-79, 2012.

LÓPEZ, V.; NAVAS, J.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J.V. Low potential virulence associated with mutations in the *inlA* and *prfA* genes in *Listeria monocytogenes* isolated from raw retail poultry meat. **Journal of Food Protection**, v.76, n.1, p.129-132, 2013.

LOZANO, M.C.; ARIAS, D.C. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 21, n. 1, p.121-135, 2008.

LUNGU, B.; O'BRYAN, C.A.; MUTHAIYAN, A.; MILILLO, S.R.; JOHNSON, M.G.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.8, n.5, p.569-578, 2011.

LV, J.; ZHENG, X.M.; CHENG, S.X.; ZHENG, H.Y.; ZENG, Y.C. Combination Use of PFGE and Drug-resistant Analysis in the Epidemiological Investigation of *Listeria Monocytogenes*. **Biomedical and Environmental Science**, v.26, n.4, p.314-318, 2013.

LYAUTEY, E.; LAPEN, D.R.; WILKES, G.; MCCLEARY, K.; PAGOTTO, F.; TYLER, K.; HARTMANN, A.; PIVETEAU, P.; RIEU, A.; ROBERTSON, W.J.; MEDEIROS, D.T.; EDGE, T.A.; GANNON, V.; TOPP, E. Distribution and characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from surface waters of the South Nation River watershed, Ontario, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.17, p.5401-5410, 2007.

LYON, S.A.; BERRANG, M.E.; FEDORKA-CRAY, P.J.; FLETCHER, D.L.; MEINERSMANN, R.J. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing plant. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.5, n.3, p.253-259, 2008.

MAMMINA, C.; ALEO, A.; ROMANI, C.; PELLISSIER, N.; NICOLETTI, P.; PECILE, P.; NASTASI, A.; PONTELLO, M.M. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.9, p.2925-2930, 2009.

MARTINS, E.A.; GERMANO, P.M.L. *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**, v.22, n.2, p.297-302, 2011.

MARTINS, I.S.; FARIA, F.C.; MIGUEL, M.A.; DIAS, M.P.; CARDOSO, F.L.; MAGALHÃES, A.C.; MASCARENHAS, L.A.; NOUÉR, S.A.; BARBOSA, A.V.; VALLIM, D.C.; HOFER, E.; RABELLO, R.F.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M.. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. *American Journal of Infection Control*, v.38, n.9, 2010.

MAUDER, N.; ECKE, R.; MERTINS, S.; LOEFFLER, D.I.; SEIDEL, G.; SPREHE, M.; HILLEN, W.; GOEBEL, W.; MÜLLER-ALTROCK, S. Species-specific differences in the activity of PrfA, the key regulator of listerial virulence genes. ***Journal of Bacteriology***, v.188, n.22, p.7941-7956, 2006.

MEAD, P.S.; DUNNE, E.F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B.D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B.; LISTERIA OUTBREAK WORKING GROUP. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. ***Epidemiology and Infection***, v.134, n.4, p.744-751, 2006.

MELLO, J.F.; EINSFELDT, K.; FRAZZON, A.P.G.; COSTA, M.; FRAZZON, J. Molecular analysis of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* isolated from cheeses in Rio Grande do Sul, Brazil. ***Brazilian Journal of Microbiology***, v.39, n.1, p.169-172, 2008.

MENDONÇA, K.S.; MICHAEL, G.B.; VON LAER, A.E.; MENEZES, D.B.; CARDOSO, M.R.I.; SILVA, W.P. Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil, ***Food Control***, v.28, n.1, p.171-177, 2012.

MILOHANIC, E.; JONQUIÈRES, R.; GLASER, P.; DEHOUX, P.; JACQUET, C.; BERCHE, P.; COSSART, P.; GAILLARD, J.L. Sequence and binding activity of the autolysin-adhesin Ami from epidemic *Listeria monocytogenes* 4b. ***Infection and Immunity***, v.72, n.8, p.4401-4409, 2004.

MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; FANNING, S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. ***Microbes and Infection***, v.8, n.7, p.1923-1930, 2006.

MIYASAKI, K.N.; CHIARINI, E.; SANT'ANA, A.S.; DESTRO, M.T.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D. High prevalence, low counts and uncommon serotypes of *Listeria monocytogenes* in linguça, a Brazilian fresh pork sausage. ***Meat Science***, v.83, n.3, p.523-527, 2009.

MOLBAK, K. Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens. ***Clinical and Infectious Diseases***, v.41, n.11, p.1613-1620, 2005.

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.** 2013. 104p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2013.

MOROSI, S.; FRANCISCI, D.; BALDELLI, F. A case of rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* successfully treated with linezolid. **The Journal of Infection**, v.52, n.3, p. 73-75, 2006.

MORVAN, A.; MOUBARECK, C.; LECLERCQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; COURVALIN, P.; LE MONNIER, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.6, p.2728-2731, 2010.

MUÑOZ, P.; ROJAS, L.; BUNSOW, E.; SAEZ, E.; SÁNCHEZ-CAMBRONERO, L.; ALCALÁ, L.; RODRÍGUEZ-CREIXEMS, M.; BOUZA, E. Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly. **The Journal of Infection**, v.64, n.1, p.19-33, 2012.

NALÉRIO, E.S. **Comparações filogenômicas entre cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de diferentes fontes e regiões geográficas.** 2009. 65p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

NALÉRIO, E.S.; ARAÚJO, M.R.; MENDONÇA, K.S.; BASSANI, M.T.; SILVA, W.P. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, 2009.

NAVRATILOVA, P.; SCHLEGELOVA, J.; SUSTACKOVA, A.; NAPRAVNIKOVA, E.; LUKASOVA, J.; KLIMOVA, E. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in milk, meat and foodstuff of animal origin and the phenotype of antibiotic resistance of isolated strains. **Veterinarni Medicine. – Czech**, v.49, n.7, 243–252, 2004.

NES, F. **Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos cárneos no RS.** 2008. 54p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

NEVES, E.; SILVA, A.C.; ROCHE, S.M.; VELGE, P.; BRITO, L. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.411-415, 2008.

NIGHTINGALE, K. *Listeria monocytogenes*: knowledge gained through DNA sequence-based subtyping, implications, and future considerations. **Journal of AOAC International**, v.93, n.4, p.1275-1286, 2010.

NORTON, D.M.; BRADEN, C.R. Foodborne listeriosis. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. **Listeria, Listeriose and Food Safety**. 3ed. New York: CRC Press, 2007, cap.10, p.305-356.

NOTERMANS, S.H.W.; DUFRENNE, J.; LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.9, p. 2666–2670, 1991.

NUCERA, D.; LOMONACO, S.; BIANCHI, D.M.; DECASTELLI, L.; GRASSI, M.A.; BOTTERO, M.T.; CIVERA, T. A five year surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n.140 (2-3), p.271-276, 2010.

O'CONNOR, L.; O'LEARY, M.; LEONARD, N.; GODINHO, M.; O'REILLY, C.; COFFEY, L.; EGAN, J.; O'MAHONY, R. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. **Letters in Applied Microbiology**, v.51, n.5, p.490-498, 2010.

OKADA, Y.; OKUTANI, A.; SUZUKI, H.; ASAKURA, H.; MONDEN, S.; NAKAMA, A.; MARUYAMA, T.; IGIMI, S. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* isolated in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.73, n.12, p.1681-1684, 2011.

OLSEN, S.J.; PATRICK, M.; HUNTER, S.B.; REDDY, V.; KORNSTEIN, L.; MACKENZIE, W.R.; LANE, K.; BIDOL, S.; STOLTMAN, G.A.; FRYE, D.M.; LEE, I.; HURD, S.; JONES, T.F.; LAPORTE, T.N.; DEWITT, W.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; SCHOONMAKER-BOPP, D.J.; HUANG, A.J.; VINCENT, C.; BUGENHAGEN, A.; CORBY, J.; CARLONI, E.R.; HOLCOMB, M.E.; WORON, R.F.; ZANSKY, S.M.; DOWDLE, G.; SMITH, F.; AHRABI-FARD, S.; ONG, A.R.; TUCKER, N.; HYNES, N.A.; MEAD, P. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. **Clinical Infectious Diseases**, v.40, n.7, p.962-967, 2005.

ORGUN, N.N.; MATHIS, M.A.; WILSON, C.B.; WAY, S.S. Deviation from a strong Th1-dominated to a modest Th17-dominated CD4 T cell response in the absence of IL-12p40 and type I IFNs sustains protective CD8 T cells. **The Journal of Immunology**, v.180, n.6, p.4109-4115, 2008.

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

ORSI, R.H.; MARON, S.B.; NIGHTINGALE, K.K.; JEROME, M.; TABOR, H.; WIEDMANN, M. Lineage specific recombination and positive selection in coding and intragenic regions contributed to evolution of the main *Listeria monocytogenes* virulence gene cluster. *Infection, Genetics and Evolution*, v.8, n.5, p.566-576, 2008.

OSAILI, T.M.; AL-NABULSI, A.A.; TAHA, M.H.; AL-HOLY, M.A.; ALABOUDI, A.R.; AL-ROUSAN, W.M.; SHAKER, R.R. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from brined white cheese in Jordan. **Journal of Science**, v.77, n.9, p.528-532, 2012.

PAILLARD, D.; DUBOIS, V.; THIEBAUT, R.; NATHIER, F.; HOOGLAND, E.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Occurrence of *Listeria* spp. in effluents of French urban wastewater treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.11, p.7562-7566, 2005.

PAINTER, J; SLUTSKER, L. Listeriosis in human. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. **Listeria, Listeriose and Food Safety**. 3ed. New York: CRC Press, 2007, cap.4, p.85-110.

PAMER, E.G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. **Nature Reviews Immunology**, v.4, n.10, p.812-823, 2004.

PAZIAK-DOMAŃSKA, B.; BOGUSLAWSKA, E.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; KOTŁOWSKI, R.; RÓZALSKA, B.; CHMIELA, M.; KUR, J.; DABROWSKI, W.; RUDNICKA, W. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiology Letters**, v.171, n.2, p.209-214, 1999.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; NIERI, D.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. **Food Control**, v.21, n.5, p. 708–713, 2010.

PILGRIM, S.; KOLB-MÄURER, A.; GENTSCHKEV, I.; GOEBEL, W.; KUHN, M. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. **Infection and Immunity**, v.71, n.6, p.3473-3484, 2003.

PONTELLO, M.; GUAITA, A.; SALA, G.; CIPOLLA, M.; GATTUSO, A.; SONNESSA, M.; GIANFRANCESCHI, M.V. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010)., v.48, n.2, p.146-150, 2012.

POSFAY-BARBE, K.M.; WALD, E.R. Listeriosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v.14, n.4, p.228-233, 2009.

POUILLOT, R.; HOELZER, K.; JACKSON, K.A.; HENAO, O.L.; SILK, B.J. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites according to age, pregnancy, and ethnicity. **Clinical Infectious Diseases**, v.54, Suppl.5, p.405-410, 2012.

POULSEN, K.P.; CZUPRYNSKI, C.J. Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. **Animal Health Research Reviews**, v.14, n.1, p.30-39, 2013.

POURSHABAN M, FERRINI AM, MANNONI V, OLIVA B, AURELI P Transferable tetracycline resistance in *Listeria monocytogenes* from food in Italy. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, n.7, p.564-566, 2002.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURTIEU, A.L.; COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **Lancet**, v.335, n.8703, p.1422-1426, 1990.

RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LE MONNIER, A.; BRISSE, S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathogens**, v.4, n.9, e1000146, 2008.

RAHIMI, E.; YAZDI, F.; FARZINEZHADIZADEH, H. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from different types of raw meat in Iran. **Journal of Food Protection**, v.75, n.12, p. 2223-2227, 2012.

RAJABIAN T, GAVICHERLA B, HEISIG M, MÜLLER-ALTROCK S, GOEBEL W, GRAY-OWEN SD, IRETON K. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. **Nature Cell Biology**, v.11, n.10, p.1212-1218, 2009.

RAJIĆ, A.; WADDELL, L.A.; SARGEANT, J.M.; READ, S.; FARBER, J.; FIRTH, M.J.; CHAMBERS, A. An overview of microbial food safety programs in beef, pork, and poultry from farm to processing in Canada. **Journal of Food Protection**, v.70, n.5, 1286-1294, 2007.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.40, n.1, p.4-13, 2007.

RAWOOL, D.B.; MALIK, S.V.; SHAKUNTALA, I.; SAHARE, A.M.; BARBUDDHE, S.B. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, n.2, p.201-207, 2007.

REIS, C.M.; BARBOSA, A.V.; RUSAK, L.A.; VALLIM, D.C.; HOFER, E. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.173-176, 2011.

REIS, O.; SOUSA, S.; CAMEJO, A.; VILLIERS, V.; GOUIN, E.; COSSART, P.; CABANES, D. LapB, a novel *Listeria monocytogenes* LPXTG surface adhesin, required for entry into eukaryotic cells and virulence. **Journal Infectious Diseases**, v.202, n.4, p.551-562, 2010.

RISTORI, C.A. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 2010. 127p. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RISTORI, C.A.; ROWLANDS, R.E.G.; BERGAMINI, A.M.M.; LOPES, G.I.S.L.; PAULA, A.M.R.de ; OLIVEIRA, M.A.; LIMA, M.J.C.; TEGANI, L.S.; WATANABE, A.H.; JAKABI, M. ; ZANELLA, R.C. Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of Enterococcus. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 71, p. 237-243, 2012.

RIZZOTTI, L.; LA GIOIA, F.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.96, n.1, p.43-52, 2009.

ROBERTS, A.; CHAN, Y.; WIEDMANN, M. Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p. 3900-3910, 2005.

ROBERTS, A.J.; WIEDMANN, M. Allelic exchange and site-directed mutagenesis probe the contribution of ActA amino-acid variability to phosphorylation and virulence-associated phenotypes among *Listeria monocytogenes* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.254, n.2, p.300-307, 2006.

ROBERTS, M.C.; FACINELLI, B.; GIOVANETTI, E.; VARALDO, P.E. Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.1, p.269-270, 1996.

ROCHE, S.M.; GRÉPINET, O.; CORDE, Y.; TEIXEIRA, A.P.; KEROUANTON, A.; TÉMOIN, S.; MEREGHETTI, L.; BRISABOIS, A.; VELGE, P. A *Listeria monocytogenes* strain is still virulent despite nonfunctional major virulence genes. **Journal Infectious Disease**, v.200, n.12, p.1944-8, 2009.

ROCHE, S.M.; GRÉPINET, O.; KEROUANTON, A.; RAGON, M.; LECLERCQ, A.; TÉMOIN, S.; SCHAEFFER, B.; SKORSKI, G.; MEREGHETTI, L.; LE MONNIER, A.; VELGE P. Polyphasic characterization and genetic relatedness of low-virulence and virulent *Listeria monocytogenes* isolates. **BMC Microbiology**, v.12, n.304, p.1-12, 2012.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. eds. ***Listeria*, Listeriose and Food Safety**. 3ed. New York: CRC Press, 2007, cap.1, p.1-20.

RUIZ-BOLIVAR, Z.; NEUQUE-RICO, M.C.; POUTOU-PIÑALES, R.A.; CARRASCAL-CAMACHO, A.K.; MATTAR, S. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* food isolates from different cities in Colombia. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.8, n.8, p. 913-919, 2011.

SABET, C.; LECUIT, M.; CABANES, D.; COSSART, P.; BIERNE, H. LPXTG protein InlJ, a newly identified internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6912-6922, 2005.

SABET, C.; TOLEDO-ARANA, A.; PERSONNIC, N.; LECUIT, M.; DUBRAC, S.; POUPEL, O.; GOUIN, E.; NAHORI, M.A.; COSSART, P.; BIERNE, H. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. **Infection and Immunity**, v.76, n.4, p.1368-78, 2008.

SAHLSTRÖM, L.; ASPAN, A.; BAGGE, E.; DANIELSSON-THAM, M.L.; ALBIHN A. Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. **Water Research**, v.38, n.8, p.1989-1994, 2004.

SAKARIDIS, I.; SOULTOS, N.; IOSSIFIDOU, E.; PAPA, A.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated in chicken slaughterhouses in Northern Greece. **Journal of Food Protection**, v.74, n.6, p.1017-1021, 2011.

SALAMANO, R.; BRASELLI, A.; HOPPE, A.; MONTEGHIRFO, R.; SILVA, T. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.63, n.4, p.1063-1069, 2005.

SANT'ANA, A.S.; IGARASHI, M.C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, n.1-2, p.1-9, 2012.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v.65, n.5, p. 725-759, 2006.

SAUDERS, B.D.; OVERDEVEST, J.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; WIEDMANN, M. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.12, p.4420-4433, 2012.

SCALLAN, E.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V., HOEKSTRA, R.M. Foodborne illness acquired in the United States--unspecified agents. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, p.16-22, 2011a.

SCALLAN,E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.1, p.7-15, 2011b.

SCHLECH., W.F. 3RD.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v.308, n.4, p.203-206, 1983.

SCHNUPF, P.; PORTNOY, D.A. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, p.1176-1187, 2007.

SCHODER,D.; MELZNER, D.; SCHMALWIESER A, ZANGANA A, WINTER P, WAGNER M. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. **Journal of Food Protection**, v,74, n.6, p.919-924, 2011.

SCHRAMA, D.; HELLIWELL, N.; NETO, L.; FALEIRO, M.L. Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model. **Letters in Applied Microbiology**, v.56, n.6, p.421-427, 2013.

SCHUBERT, W.D.; URBANKE, C.; ZIEHM, T.; BEIER, V.; MACHNER, M.P.; DOMANN, E.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; HEINZ, D.W. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. **Cell**, v.111, n.6, p.825-836, 2002.

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

SHEN, J.; RUMP, L.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; WANG, X.; MENG, J. Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. **Food Microbiology**, v.35, n.1, p.58-64, 2013.

SHEN, Y.; NAUJOKAS, M.; PARK, M.; IRETON, K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. **Cell**, v.103, n.3, p.501-510, 2000.

SHERRID, A.M.; KOLLMANN, T.R. Age-dependent differences in systemic and cell-autonomous immunity to *L. monocytogenes*. **Clinical and Development Immunology**, v.2013, p.1-13, 2013.

SILVEIRA, J.G. **Investigação de *Listeria* sp. e microrganismos mesófilos totais em carcaças bovinas e em ambiente industrial de abatedouro frigorífico.** 2010. 65p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SKOBLE, J.; PORTNOY, D.A.; WELCH, M.D. Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. **The Journal of Cell Biology**, v.150, n.3, p.527-538, 2000.

SLEATOR, D.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.1, p.1-9, 2003.

SMITH, G.A.; PORTNOY, D.A. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. **Trends in Microbiology**, v.5, n.7, p.272-276, 1997.

SMITH, G.A.; THERIOT, J.A.; PORTNOY, D.A. The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. **The Journal of Cell Biology**, v.135, n.3, p.647-660, 1996.

SMITH, M.A.; TAKEUCHI, K.; ANDERSON, G.; WARE, G.O.; MCCLURE, H.M.; RAYBOURNE, R.B.; MYTLE, N.; DOYLE, M.P. Dose-response model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths in nonhuman primates. **Infection and Immunity**, v.76, n.2, p.726-731, 2008.

SONI, D.K.; SINGH, R.K.; SINGH, D.V.; DUBEY, S.K. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Ganges water, human clinical and milk samples at Varanasi, India. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v.14, p.83-91, 2013.

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

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

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0.*Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Arizona State University. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/24/8/1596.full.pdf+html>. Acesso em jul.2013.

TÉMOIN, S.; ROCHE, S.M.; GRÉPINET, O.; FARDINI, Y.; VELGE, P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. **Microbiology**, v.154(Pt 3), 939-948, 2008.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v.119, n. 6A, p.3-10, 2006.

THÉVENOT, D.; DERNBURG, A.; VERNZOY-ROZAND, C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, n.1, p.7-17, 2006.

TOOMEY, N.; MONAGHAN, A.; FANNING, S.; BOLTON, DJ. Assessment of antimicrobial resistance transfer between lactic acid bacteria and potential foodborne pathogens using in vitro methods and mating in a food matrix. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.8, p.925-933, 2009.

TOYOSHIMA, M.T.; APANAVICIUS, A.; DE MATOS SOEIRO, A.; DE ALMEIDA, G.M.; ARAI, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.48, n.5, p.291-293, 2006.

TRAVIER, L.; GUADAGNINI, S.; GOUIN, E.; DUFOUR, A.; CHENAL-FRANCISQUE, V.; COSSART, P.; OLIVO-MARIN, J.C.; GHIGO, J.M.; DISSON, O.; LECUIT, M. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. **PLoS Pathogens**, v.9, n.1, p. 1-16, 2013.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Contribution of *Listeria monocytogenes* RecA to acid and bile survival and invasion of human intestinal Caco-2 cells. **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, n.4, p.334-340, 2011.

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

VASCONCELOS, R.M.D.; ALMEIDA, A.E.C.C.D.; HOFER, E.; SILVA, N.M.M.D.; MARIN, V.A. Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p.836-838, 2008.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.584-560, 2001.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; OHAYON, H.; GEOFFROY, C.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, v.60, n.1, p.219-230, 1992.

VERRAES, C.; VAN BOXSTAEL, S.; VAN MEERVENNE, E.; VAN COILLIE, E.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; DE SCHAEZEN, M.A.; VAN HUFFEL, X.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K.; DAUBE, G.; SAEGERMAN, C.; DE BLOCK, J.; DEWULF, J.; HERMAN, L. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.10, n.7, p.2643-2669, 2013.

VISWANATH, P.; MURUGESAN, L.; KNABEL, S.J.; VERGHESE, B.; CHIKTHIMMAH, N.; LABORDE, L.F. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in a small-scale mushroom production facility. **Journal of Food Protection**, v.76, n.4, p.608-615, 2013.

VITAS, A.I.; SÁNCHEZ, R.M.; AGUADO, V.; GARCÍA-JALÓN, I. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p. 2402-2406, 2007.

WARD, T.J.; DUCEY, T.F.; USGAARD, T.; DUNN, K.A.; BIELAWSKI, J.P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.24, p.7629-7642, 2008.

WARD, T.J.; GORSKI, L.; BORUCKI, M.K.; MANDRELL, R.E.; HUTCHINS, J.; PUPEDIS, K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.15, p.4994-5002, 2004.

WERBER, D.; HILLE, K.; FRANK, C.; DEHNERT, M.; ALTMANN, D.; MÜLLER-NORDHORN, J.; KOCH, J.; STARK, K. Years of potential life lost for six major enteric pathogens, Germany, 2004-2008. **Epidemiology and Infection**, v.20, p.1-8, 2012.

WIECZOREK, K.; DMOWSKA, K.; OSEK, J. Characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from retail beef meat in Poland. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, n.8, p.681-685, 2012.

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

WIEDMANN, M.; BRUCE, J.L.; KEATING, C.; JOHNSON, A.E.; MCDONOUGH, P.L.; BATT, C.A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v.65, n.7, p.2707-2716, 1997.

WILLIAMS, D.; IRVIN, E.A.; CHMIELEWSKI, R.A.; FRANK, J.F.; SMITH, M.A. Dose-response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. **Journal of Food Protection**, v.70, n.5, p.1122-1128, 2007.

WINTER, C.H.; BROCKMANN, S.O.; SONNENTAG, S.R.; SCHAUPP, T.; PRAGER, R.; HOF, H.; BECKER, B.; STEGMANN, T.; ROLOFF, H.U.; VOLLRATH, G.; KUHM, A.E.; MEZGER, B.B.; SCHMOLZ, G.K.; KLITTICH, G.B.; PFAFF, G.; PIECHOTOWSKI, I. Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.2, p.21-28, 2009.

WONG, W.C.; PUI, C.F.; TUNUNG, R.; UBONG, A.; NOOR HIDAYAH, M.S.; FARINAZLEEN, M.G.; NOORLIS, A.; CHEAH, YK.; SON, R. Antibigram Pattern among Cultures of *Listeria monocytogenes* Isolated from Frozen Burger Patties in Malaysia. **Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science**, pv.35, n.4, p. 793 – 804, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness**. Fact sheet N°237, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/index.html>. Acesso: out 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The evolving threat of antimicrobial resistance. Options for action**. 2012. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf. Acesso: out 2012.

XAYARATH, B.; MARQUIS, H.; PORT, G.C.; FREITAG, N.E. *Listeria monocytogenes* CtaP is a multifunctional cysteine transport-associated protein required for bacterial pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v.74, p.4, p.956-973, 2009.

YAN, H.; NEOGI, S.B.; MO, Z.; GUAN, W.; SHEN, Z.; ZHANG, S.; LI, L.; YAMASAKI, S.; SHI, L.; ZHONG, N. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. *International Journal of Food Microbiology*, v.144, n.2, p.360-366, 2010.

ZHANG, W.; WANG, X.; XIA, X.; YANG, B.; XI, M.; MENG, J. Isolation and Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolates from Retail Foods in Shaanxi Province, China. **Foodborne Pathogens and Disease**. 2013 [Epub ahead of print].

ZHOU, X.; JIAO, X.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial *actA* sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.217-224, 2005.

ZHU, L.; FENG, X.; ZHANG, L.; ZHU, R.; LUO, X. Prevalence and serotypes of *Listeria monocytogenes* contamination in Chinese beef processing plants. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.9, n.6, p.556-560, 2012.