

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

Fernanda De Nes

Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de  
linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos  
lácteos no RS

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, Brasil  
Fevereiro, 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de  
linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos  
lácteos no RS

Fernanda De Nes

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Porto Alegre, Fevereiro de 2008.

Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de  
linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos  
lácteos no RS

Fernanda De Nes

JEVERSON FRAZZON

Orientador PPGCTA/UFRGS

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Pela banca examinadora:

ERNA VOGT DE JONG

Coordenadora do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos (PPGCTA)

PEDRO D'AZEVEDO

Doutor em Microbiologia  
FFFCMPA

AMANDA DE SOUZA DA MOTTA

Doutora em Ciências Veterinárias  
ICBS/UFRGS

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus por ter me concedido a vida, saúde e permitir o alcance de meus objetivos.

Ao meu orientador, Dr. Jeverson Frazzon pela dedicação, orientação, ensinamentos e conselhos.

A todos os professores do PPGCTA.

Aos colegas de mestrado da turma de 2006 pela cooperação.

Aos colegas do Laboratório 209N pela amizade, companheirismo. Em especial a Jozi, Gustavo e a Bianca minha fiel companheira de Laboratório pela amizade e apoio em todos os momentos.

A Prfa. Dr. Ana Paula Frazzon pelo apoio científico.

Ao Prof. Dr. Pedro D'Azevedo por ceder o Laboratório de Microbiologia para a realização de algumas análises.

Aos professores membros da banca examinadora pelas importantes contribuições neste trabalho.

A minha família, e ao Alex pelo apoio e incentivo em mais este desafio. Pelo carinho, confiança, compreensão dos momentos em que estive ausente.

E a todos que, direta ou indiretamente, cooperaram com este resumo de esforço.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	9
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 – Gênero <i>Listeria</i> .....	11
2.2 – <i>Listeria monocytogenes</i> . ....	13
2.3 – Listerioses .....	13
2.4 – Tratamento da Listeriose .....	16
2.5 – Surtos de Listeriose.....	17
2.5.1 – Casos de Listeriose no Brasil .....	18
2.6 – Mecanismos de Virulência.....	20
2.6.1 – Vida Intracelular .....	20
2.6.2 – Genes de Virulência de <i>Listeria</i> sp. ....	21
2.6.3 – Evolução dos genes de virulência de <i>Listeria</i> sp.....	23
2.6.4 – Internalinas .....	24
2.7 - Caracterização molecular.....	27
3 - OBJETIVOS.....	29
3.1 – Objetivo Geral.....	29
3.2 – Objetivos Específicos .....	29
4 – MÉTODOS e RESULTADOS .....	30
4.1 – Artigo Científico .....	31
5 – CONCLUSÕES.....	48
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

## LISTA DE ABREVIACOES

**REA** – Anlise por Enzimas de Restrio

**RAPD** – Amplificao Randômica de DNA Polimórfico

**UFC** – Unidade Formadora de Colnia

**TMP-SMX** – Sulfametoxazol-trimetoprima

**pH** – Logaritmo decimal do inverso da atividade de ins de hidrognio em uma soluo

**µm** – Micrmetro

**pb** – pares de base

**DNA** – cido desoxirribonucléico

**G + C** – Conteúdo de Guanina e Citosina

**ATCC** – American Type Culture Collection

**PCR** – Reao de Polimerizao em Cadeia

**µL** – Microlitro

## RESUMO

Caracterização molecular e susceptibilidade antimicrobiana de linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos no RS

Mestranda: Fernanda De Nes

Orientador: Jeverson Frazzon

*Listeria monocytogenes* é o microrganismo causador de listeriose, uma doença infecciosa adquirida através do consumo de alimentos contaminados e que afeta principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido como gestantes e recém nascidos. É um microrganismo ambiental, podendo ser encontrado no solo, água e alimentos como vegetais, produtos cárneos, leites crus ou mal pasteurizados, queijos, entre outros. São bactérias invasivas e possuem facilidade para penetrar na célula hospedeira. O ataque a essas células é intermediado pelas internalinas, que são proteínas associadas a genes de virulência. As internalinas InIA e InIB, codificadas pelo gene *inIAB*, são proteínas associadas com a invasão e internalização da bactéria na célula hospedeira. Este trabalho teve o objetivo de caracterizar um total de 19 linhagens de *Listeria monocytogenes*, sorovares 1/2b, 1/2a, 4b, 4c, isoladas de produtos lácteos do Rio Grande do Sul. Para a caracterização molecular foram utilizadas as técnicas moleculares de Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD) e Análise por Enzimas de Restrição (PCR-REA), com a amplificação de um segmento de 2916 pb que incluem partes dos genes *inIA* e *inIB*, utilizando para isso duas enzimas de restrição *AluI* e *EcoRI*. As técnicas moleculares utilizadas foram ferramentas úteis para caracterizar as linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos do Rio Grande do Sul. Ainda, foi observado o perfil de resistência antimicrobiana desses microrganismos frente a vários antimicrobianos, das amostras analisadas todas foram susceptíveis aos antimicrobianos testados.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*, PCR-REA, RAPD, produtos lácteos

## ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is a microorganism which causes listeriosis, an infection disease caused by consuming contaminated food and it mainly affects individuals with the immune system at risk like pregnant women and newborn infants. It is an environmental microorganism, being found in soil, water and food like vegetables, meat products, unpasteurized milk and cheese. They are invasive bacteria which have special facility to penetrate the host cell. The attack to those cells is carried out by internalins, which are proteins associated with virulence genes. The InIA and InIB internalins, codified by *inIAB* gene, are proteins associated with the invasion and internalization of the bacteria in the host cell. This work aimed at categorizing a total of 19 strains of *Listeria monocytogenes*, 1/2b, 1/2a, 4b and 4c serovars, isolated from dairy products from the State of Rio Grande do Sul. For the molecular categorization, it was used the molecular techniques of Polymorphic DNA Random Amplification (RAPD) and Restriction Enzymatic Analysis (PCR-REA), with the amplification of a segment of 2916 pb which includes part of *inIA* and *inIB* genes, using for that purpose two restriction enzymes, *AluI* and *EcoRI*. The molecular techniques applied were useful tools to categorize strains of *L. monocytogenes* isolated from dairy products of the State of Rio Grande do Sul. Furthermore, it was observed the antimicrobial resistant profile of those microorganisms in front of various antimicrobials. All of the analyzed samples were susceptible to tested antimicrobials.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, PCR-REA, RAPD, dairy products



## 1 – INTRODUÇÃO

O gênero *Listeria* compreende seis espécies dentre as quais, *Listeria monocytogenes* é conhecida por sua patogenicidade em humanos, causando listeriose uma grave doença com alta taxa de mortalidade, que atinge, principalmente, indivíduos com o sistema imune comprometido, como grávidas, idosos, recém-nascidos, portadores de neoplasias e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Diferente da maioria das doenças tóxico-alimentares, a listeriose possui um longo período de incubação e índice de mortalidade em torno de 30%, mesmo com adequado tratamento antimicrobiano.

Em geral, a maioria das linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas, de alimentos e do meio ambiente, é susceptível aos antimicrobianos ativos contra bactérias gram-positivas. No entanto, a emergência de bactérias resistentes aos antimicrobianos é de fundamental importância, pois pode resultar, no futuro, em falhas terapêuticas com conseqüente aumento da morbidade e letalidade (WHITE et al., 2002). O maior interesse pelo estudo da *Listeria* spp. iniciou-se na década de 80 com o relato de surtos ligados à ingestão de alimentos contaminados como: consumo de salada de repolho cru no Canadá, em 1981, leite pasteurizado na Califórnia, em 1985 e queijos moles na Suíça entre 1983-1987 (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 1999).

Sendo a *L. monocytogenes* um microrganismo ambiental, ela pode estar presente em diversos alimentos como leites crus e pasteurizados, queijos, carne e produtos cárneos, vegetais entre outros. Possui a capacidade de formar biofilme e assim permanecer na superfície de equipamentos em indústrias, podendo causar contaminação cruzada em produtos já prontos para o consumo, principalmente aqueles que ficarão estocados longos períodos sob refrigeração. Caracteriza uma grande preocupação para a indústria de alimentos, visto que, a *L. monocytogenes* é hábil em sobreviver e, inclusive, se multiplicar em temperaturas de refrigeração, alcançando níveis elevados nos alimentos, que muitas vezes serão consumidos sem prévio tratamento térmico. Sua ocorrência é elevada em países desenvolvidos nos quais há maior consumo de alimentos industrializados, preocupação que vem

aumentando no Brasil, devido à mudança nos hábitos alimentares da população com a crescente procura por estes produtos.

As técnicas moleculares, que possuem maior poder de discriminação quando comparadas a métodos tradicionais, são úteis para avaliar a distribuição de linhagens de *L. monocytogenes* na indústria de alimentos. Dentre estas técnicas pode-se destacar a Amplificação Randômica do DNA Polimórfico (RAPD) e Análise por Enzimas de Restrição (PCR-REA) (GIOVANNACI et al., 1999).

A técnica de RAPD tem sido usada em várias pesquisas (GRAVESEN et al., 2000; INOUE et al., 2001; CABRITA et al., 2004; CARMINATI et al., 2004; LEITE et al., 2006) para diferenciar as linhagens de *L. monocytogenes* e ao mesmo tempo traçar as possíveis origens da contaminação, estabelecendo assim um estudo epidemiológico do microrganismo. É, também, considerado um método fácil, rápido e com excelente poder de discriminação, conforme observado por Aguado et al. (2004), que caracterizou *L. monocytogenes* e *Listeria innocua* de vegetais minimamente processados na planta industrial, usando a referida técnica, juntamente com a técnica de REA.

A técnica de REA é considerada um método molecular eficiente para análises taxonômicas, bem como para o estudo epidemiológico (GIOVANNACI et al., 1999). Segundo Ericsson et al. (1995), que estudou o polimorfismo existente entre os genes *inIA* e *inIB*, o método comprovou ser eficiente para distinguir linhagens de *L. monocytogenes* sorovar 4b.

Com o objetivo de aumentar as informações referentes à bactéria *L. monocytogenes*, existentes no Brasil e no estado do Rio Grande do Sul as técnicas moleculares, RAPD e PCR-REA foram utilizadas para analisar e caracterizar 19 linhagens isoladas de produtos lácteos no RS. Ainda, foi observado o perfil de resistência antimicrobiana desses microrganismos frente a vários antimicrobianos.

## 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Gênero *Listeria*

Os microrganismos do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivos, não esporulados, possuem baixa proporção de G+C em seu genoma, em torno de 37%, característica cuja classificação aproxima o gênero *Listeria* spp. aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. *Listeria* spp. são microrganismos anaeróbios facultativos, em média possuem 1 a 2 µm de comprimento e 0,5 µm de largura, móveis à temperatura de 10 a 25°C. Em relação à faixa de pH, a melhor encontra-se entre 6 a 8, porém ainda não está bem definido o pH mínimo para o crescimento e sobrevivência do gênero, podendo este, variar com a temperatura de incubação, atividade de água, composição dos nutrientes entre outros (JAY, 2005).

As espécies de gênero *Listeria* se caracterizam também por apresentar reação de catalase positiva, oxidase negativa e não apresentam hidrólise da uréia e, portanto, redução de nitrato (LOW; DONACHE, 1997). Possuem temperatura ótima de crescimento entre 30 e 37°C, porém a temperatura mínima de crescimento encontra-se entre 1,7°C a 3,0°C e a máxima é cerca de 45°C (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999). Caracterizam-se, também, como microrganismos ambientais e, portanto encontram-se amplamente distribuídos na natureza podendo ser encontrados em vegetação deteriorada, solos, fezes de animais, silagem, esgotos, água, carne crua e processada, leite, queijo, vegetais crus, restos de matadouro e portadores assintomáticos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). O gênero *Listeria* inclui seis espécies: *L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *L. innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*, destas, apesar de haver relato de casos de listeriose com *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. innocua* (PERRIN et al., 2003), apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas, a primeira normalmente relacionada com infecções em humanos e a segunda relacionada com abortos em animais (SNAPIR et al., 2006).

A diferenciação das espécies do gênero *Listeria* spp. está baseada na presença de atividade hemolítica e na fermentação de açúcares como demonstrado na tabela 1 (JEMMI; STEPHAN, 2006).

**Tabela 1 – Diferenciação Bioquímica das espécies de *Listeria***

<i>Listeria</i> spp.	Hemólise	CAMP	Produção de ácido		
			D-Xilose	L-Rhamnose	Manitol
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	–	+	–
<i>L. seeligeri</i>	+	+/-	+	–	–
<i>L. ivanovii</i>	++	–	+	–	–
<i>L. innocua</i>	–	–	–	V	–
<i>L. welshimeri</i>	–	–	+	V	–
<i>L. grayi</i>	–	–	–	V	+

+: positivo    +/-: levemente positivo    -: negativo    V: variável

CAMP: referência aos descobridores do fenômeno de hemólise: Christie, Atkins, Munch, Petersen

As espécies de *Listeria* são caracterizadas por seus antígenos, que determinam 17 sorovares, dos quais 13 são representados pela *L. monocytogenes*, principal espécie patogênica. Alguns desses sorovares são compartilhados com *L. seeligeri* e *L. innocua*. *L. innocua* é muitas vezes considerada uma variante não patogênica da *L. monocytogenes* e, além disso, um indicador da contaminação por *L. monocytogenes* (AGUADO et al., 2004). Em relação aos isolados alimentares os principais sorovares encontrados pertencem ao grupo antigênico 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c), enquanto que 95% das infecções em humanos são causadas por três sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (CABRITA et al., 2004; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT et al., 2007).

## **2.2 – *Listeria monocytogenes***

É o principal agente causador de listeriose, grave doença com altas taxas de mortalidade. Devido a sua natureza ubíqua, ela pode ser constantemente isolada, na natureza, de matéria em decomposição e assim contaminando, assim alimentos crus e, através da contaminação cruzada, outros produtos como queijos e produtos lácteos, produtos cárneos, pescados, produtos prontos para o consumo, que muitas vezes serão consumidos sem prévio tratamento térmico (FARBER; PETERKIN, 1991).

O microrganismo possui grande habilidade de crescer e suportar condições adversas como baixas temperaturas, pH ácido, altas concentrações de sal, processos que são utilizados pelas indústrias alimentícias para barrar o crescimento dos microrganismos patógenos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Além disso, possui facilidade de colonização de superfícies e formação de biofilmes sobre equipamentos da indústria de alimentos e ali permanecer por longos períodos de tempo, há relatos de sobrevivência superior a 10 anos (KATHARIOU, 2002; TOMPKIN, 2002; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Os biofilmes são complexos ecossistemas microbiológicos embebidos em uma matriz de polímeros orgânicos, aderidos a uma superfície. A formação dos biofilmes aumenta a resistência a sanitizantes, desinfetantes e agentes antimicrobianos, desta forma, prejudicando a sua remoção da superfície de equipamentos (ROBBINS et al., 2005). É uma preocupação para a indústria, pois, trata-se de uma possível fonte de contaminação cruzada de alimentos.

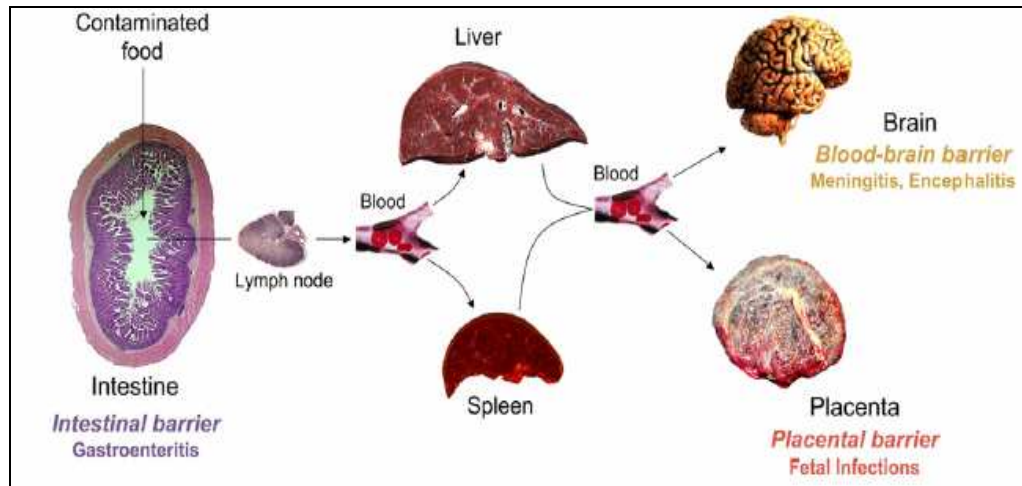
## **2.3 – Listerioses**

A listeriose é uma enfermidade causada pela *L. monocytogenes*, o primeiro caso descrito em humanos ocorreu na década de 20, posteriormente, a partir da

década de 80 vários casos foram relatados. É considerado um sério problema de saúde devido à severidade dos sintomas e alta taxa de mortalidade, em torno de 30% apesar de adequado tratamento antimicrobiano (LOW; DONACHE, 1997; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007;). A principal fonte de transmissão é a ingestão de alimentos contaminados. A listeriose atinge principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido como grávidas, recém nascidos, idosos, diabéticos, portadores de neoplasias e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (FARBER; PETERKIN, 1991).

A dose infectiva da *L. monocytogenes*, bem como, seu período de incubação não estão bem definidos e acredita-se que o aparecimento dos sintomas possa ocorrer de 10 a 70 dias, dificultando a identificação da origem de contaminação em casos isolados (LECUIT, 2007). Em relação à dose infectiva, esta depende do número de microrganismos ingeridos, da susceptibilidade do hospedeiro e da linhagem envolvida (MCLAUCHLIN, 2004). Segundo Jemmi e Stephan (2006) a quantidade de microrganismos ingeridos, para o desenvolvimento de listeriose, poderia variar de  $10^2$  a  $10^9$  ufc dependendo do estado imunológico do indivíduo.

Os sintomas são bastante parecidos entre todos os indivíduos infectados. Duas formas básicas podem ser observadas: a listeriose neonatal e listeriose em adultos (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). Na sua forma invasiva, a *L. monocytogenes*, adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, é capaz de atravessar a barreira intestinal alcançando fígado e baço, podendo nestes órgãos, multiplicar-se em altos níveis, causando bacteremia e migrar até o cérebro ou placenta causando meningite e encefalite em indivíduos com o sistema imunológico comprometido, abortos em grávidas e infecção generalizada em neonatos como mostra a Figura 1.



Fonte: Lecuit, (2007).

Figura 1 – Ilustração do caminho da listeriose no hospedeiro infectado.

A placenta é um órgão cuja principal função é a de proteger o feto de agressões externas, incluindo microrganismos patógenos, no entanto, alguns microrganismos, como *L. monocytogenes*, são capazes de atravessar esta barreira. A listeriose em grávidas pode ocorrer durante todo o período de gestação, porém, é diagnosticada principalmente no terceiro trimestre (MONNIER et al., 2006). A infecção normalmente apresenta-se assintomática na mãe ou com sintomas semelhantes à de um leve resfriado, enquanto que o feto desenvolve infecção generalizada conhecida como granulomatosis infantiseptica que pode resultar em morte ou parto prematuro (SILVER, 1998). Vinte e dois por cento desses casos podem resultar em natimorto e morte ao nascer (DOGANAY, 2003). Em adultos, atinge principalmente o Sistema Nervoso Central (SNC) causando meningite e romboencefalite. Bacteremia e septicemia são outros freqüentes sintomas observados em casos de listeriose, correspondem de 15 a 50% dos casos, e com alta taxa de mortalidade em torno de 70% (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). Além das enfermidades sistêmicas, também podem ser observadas infecções locais incluindo endocardite, infecção pulmonar, artrite séptica, osteomielite, peritonite e hepatite que podem ser causadas por bacteremia (ROCOURT, 1996; SCHLECH, 1998). Listeriose cutânea em adultos é rara, porém, já foi relatada nos EUA tendo sido causada pelo contato com animais contaminados. Cain e MCcannt (1986) relataram o caso de um homem de 64 anos que, dias após auxiliar o parto de uma vaca observou algumas lesões na pele. Após análises, do material coletado das

lesões e do animal constatou-se que as linhagens de *L. monocytogenes* encontradas eram idênticas (Figura 2). Diferente de outras doenças tóxico-alimentares, casos de gastroenterites são observados, geralmente, em indivíduos saudáveis após a ingestão de alimentos altamente contaminados.



Fonte: Cain; McCann, (1986).

Figura 2 – Ilustra as lesões causadas por listeriose cutânea.

## 2.4 – Tratamento da listeriose

O tratamento de escolha para a listeriose em sua forma invasiva consiste na administração de altas doses de penicilina ou ampicilina normalmente associada a um aminoglicosídeo. Para pacientes alérgicos as penicilinas, o tratamento é feito, com sucesso, utilizando a combinação de vancomicina e um aminoglicosídeo ou sulfametoxazol-trimetoprima (TMP-SMX) em associação com rifampicina. As linhagens de *L. monocytogenes* são, normalmente, resistentes as cefalosporinas, e por esse motivo não devem ser usadas no tratamento da listeriose (SCHLECH, 1998; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007). Segundo estudos feitos por Troxler et al. (2000), as linhagens de *L. monocytogenes* são naturalmente



susceptíveis as penicilinas, aminoglicosídeos, trimetoprima, tetraciclina, macrolídeos e vancomicina. Reduzida susceptibilidade antimicrobiana, foi verificada, com sulfametoxazol, cefalosporinas e quinolonas, mas normalmente susceptíveis às fluorquinolonas. Em 1988, foi isolada de material clínico humano, na França, a primeira linhagem de *L. monocytogenes* multiresistente a antimicrobianos. A resistência foi devido à transferência plasmidial cuja origem acredita-se ser enterococci-streptococci (HANSEN et al., 2005). A incidência de resistência entre os isolados é baixa, porém, em estudo feito por Srinivasan et al., (2005), linhagens de *L. monocytogenes* isoladas de uma fazenda produtora de leite foram resistentes a vários antimicrobianos entre eles ampicilina e rifampicina. O aumento de resistência entre isolados animais pode indicar um possível aumento na resistência de isolados clínicos. Safdar e Armstrong (2003) analisaram a susceptibilidade de 84 isolados clínicos de *L. monocytogenes*, verificando que, todas as amostras foram sensíveis a amicacina, ciprofloxacino, imipinem, rifampicina, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMX) e vancomicina. Em relação aos outros antimicrobianos estudados, a maioria das linhagens foi sensível, penicilina (97,6%), ampicilina (90,7%), eritromicina (98,8%), tetraciclina (96,6%) e gentamicina (98%).

No Brasil, estudo feito com 13 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de 12 casos clínicos de listeriose ocorridos na região sudoeste de São Paulo, no período de janeiro de 1995 a maio de 2005, foram submetidas a teste de sensibilidade em relação aos seguintes antimicrobianos: ampicilina, gentamicina, trimetoprima, sulfametoxazol e vancomicina. Nenhum dos isolados clínicos apresentou resistência com exceção de sete linhagens que tiveram sensibilidade reduzida ao sulfametoxazol (LEMES-MARQUES, et al., 2007).

## **2.5 – Surtos de Listeriose**

Casos esporádicos e surtos de listeriose já foram identificados no mundo todo, destacando-se América do Norte e Europa como os locais de maior incidência de surtos. A Tabela 2 resume os principais surtos de listeriose ocorridos no mundo

no período de 1980 a 2005. O consumo de alimentos contaminados como queijos, vegetais e produtos cárneos estão diretamente ligados a estes casos. Para diminuir a incidência de surtos, medidas de controle estão sendo adotadas em muitos países como nos Estados Unidos que recomenda, em amostras de 25g, menos de 0,04 ufc/g (WALLS; BUCHANAN, 2005).

### **2.5.1 – Casos de listeriose no Brasil**

No Brasil, as informações a respeito da listeriose são deficientes, tendo em vista, que, não há estatísticas oficiais a respeito da doença, pois sua notificação não é obrigatória. Surtos, ainda não foram identificados, apenas relatos de casos isolados, dentre eles, meningite em pacientes do Distrito Federal (HOFER et al., 1998), cinco casos de bacteremia em transplantados renais, de um mesmo hospital de São Paulo, no período de abril a dezembro de 1995 (HOFER et al., 1999), um caso de septicemia e meningite em portador de HIV (SILVA et al., 1992). Schwab e Edelweis (2003) analisaram através da técnica de imunohistoquímica material encontrado em dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros ocorridos no ano de 2000, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, das amostras estudadas cinco (50 %) revelaram a presença de *L. monocytogenes*.

**Tabela 2 – Surto de listeriose ocorridos no mundo entre 1980 – 2005.**

<b>Ano</b>	<b>Localização</b>	<b>Nº de casos</b>	<b>Casos perinatais</b>	<b>Nº de mortes</b>	<b>Veículos suspeitos e implicados</b>	<b>Sorovar</b>
1981	Canadá	41	34	18	Salada de repolho	4b
1983	Massachusetts EUA	49	7	14	Leite pasteurizado	4b
1985	Califórnia, EUA	142	94	48	Queijo-estilo mexicano	4b
1983-1987	Suíça	122	65	34	Queijo “Vacherin Mont d’Or”	4b
1987-1989	Inglaterra	366	?	?	Patê	4bx
1989-1990	Dinamarca	26	3	7	Blue mold cheese	4b
1992	França	279	0	85	Geléia de língua de porco	4b
1993	França	38	31	10	“Rilletes”	4b
1998-1999	EUA	108	?	14	Cachorro quente	4b
1999	Finlândia	25	0	6	Manteiga	3 <sup>a</sup>
1999-2000	França	10	3	3	“Rilletes”	4b
1999-2000	França	32	9	10	Língua de porco em galantina	4b
2000	EUA	30	8	7	RTE	1/2 <sup>a</sup>
2000	Carolina do Norte, EUA	13	11	5	Queijo estilo Mexicano feito em casa	4b
2002	EUA	54	12	8	RTE	4b
2002	Quebec, Canadá	17	3	0	Queijo feito com leite cru	
2003	Texas, EUA	12	?	?	Queijo estilo Mexicano	4b

Fonte: adaptada Swaminathan; Gerner-Smidt, (2007).

## 2.6 – Mecanismos de virulência

### 2.6.1 – Vida intracelular

As espécies patogênicas do gênero *Listeria* sp são bactérias invasivas facultativas e possuem facilidade para penetrar na célula do hospedeiro. São hábeis em sobreviver e multiplicar-se nos macrófagos e em várias células normalmente não fagocíticas como células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, enterócitos e hepatócitos (HAMON et al, 2006). A *L. monocytogenes* tem a propriedade de induzir a fagocitose em células não fagocíticas (como as células endoteliais encontradas no trato intestinal), penetrando nas células por um mecanismo denominado *zipper*. O ataque às células do hospedeiro é intermediado pelas internalinas, que são proteínas de superfície, formando hemolisina e fosfolipases que podem liberar o vacúolo fagocítico para o citoplasma, estimulando a polarização da actina e em consequência o movimento da bactéria. Podendo esta, alcançar as membranas externas da célula do hospedeiro e invadir as células vizinhas provocando a disseminação da listeriose no hospedeiro como mostra a Figura 3 (HAMON et al, 2006).

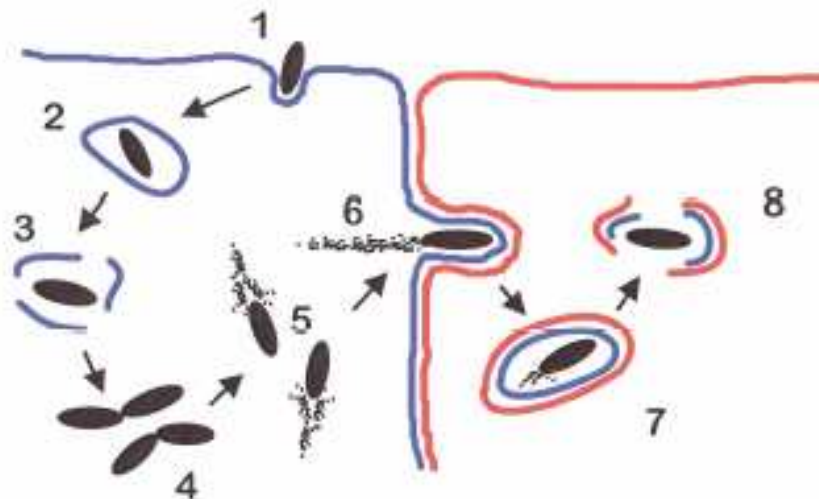


Figura 3. Esquema do ciclo de vida intracelular de *Listeria* patogênica. 1 – entrada na célula hospedeira; 2 – sobrevivência dentro do vacúolo fagocítico; 3 – rompimento da membrana fagossômica e escape no citosol; 4 – replicação no citosol; 5 – mobilidade através da cauda de actina; 6.- disseminação para célula vizinha; 7 – sobrevivência no vacúolo secundário de dupla membrana; 8 – escape do vacúolo secundário e reinício do ciclo.

Fonte: Adaptada de Vásquez-Boland, et al. (2001b).

### 2.6.2 – Genes de Virulência de *Listeria* sp.

Os genes de virulência de *Listeria* spp. estão organizados em ilhas de patogenicidade (PAIs) pressupondo-se que foram obtidas por transferência horizontal, durante a evolução da bactéria. Seis destes fatores responsáveis pelo parasitismo intracelular (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, e *plcB*) estão relacionados com a ilha de patogenicidade 1 da *Listeria* (LIPI-1), ilha cromossomal de 9 kb, que esta localizada entre os genes *prs* e *ldh* (HAIN et al, 2006). Sendo o fator mais importante a LLO (listeriolisina O) codificada pelo gene *hly* da hemolisina, que confere atividade hemolítica a *Listeria* sp., esta possui função e antigenicidade semelhantes a estreptolisina O (SLO) encontrada em *Streptococcus pyogenes*. Além disso, a hemolisina possui função importante no parasitismo intracelular, bem como na interação com o hospedeiro e é também necessária para a sobrevivência e

disseminação da *L. monocytogenes*, nestas células. No ciclo intracelular da *Listeria* sp. patogênica, atua como mediadora na ruptura da membrana externa do vacúolo primário e na dupla membrana do vacúolo secundário. O gene *hly* é um fator essencial de virulência e sua ausência confere a bactéria total avirulência (VÁSQUEZ-BOLAND et al, 2001b).

O gene *prfA*, codifica a proteína PrfA (*for positive regulatory factor A*), que é responsável pela regulação da expressão dos genes virulentos do ciclo intracelular de listeriose. PrfA é uma proteína de 27 kDa, essencial para a patogenicidade de *Listeria* sp. Algumas condições ambientais como, osmolaridade, concentração de ferro, pH, temperatura, a presença de açúcares fermentáveis e condições encontradas na célula hospedeira são indicadas como possíveis reguladoras da expressão do gene *prfA* (HAMON et al, 2006). Segundo, SCORTTI et al, (2007) o entendimento do mecanismo de regulação da virulência, desempenhado por PrfA, pode levar a novos tratamentos anti-listeria e também a definição de novos paradigmas em relação a patogenicidade microbiana.

Os genes *plcA*, e *plcB* que codificam as fosfolipases PlcA e PlcB, observadas em *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, estão associados com a ruptura dos fagossomos. PlcB, zinco-dependente, coopera com Hly e PlcA na ruptura do primeiro vacúolo fagocítico, formado após a fagocitose da bactéria, porém sua principal função consiste na dissolução da dupla membrana do fagossoma secundário. O gene *actA*, codifica a proteína ActA, responsável pela formação da cauda de actina que confere mobilidade ao microrganismo. Consiste em fator essencial para o movimento da bactéria no citosol das células eucarióticas e crucial para a virulência da bactéria (INOUE et al, 2001). O gene *mpl*, codifica a proteína Mpl, uma zinco-metaloenzima, que possui atividade proteolítica. As proteínas codificadas pelo operon *mpl-actA-plcB*, estão envolvidas em uma função fundamental na patogenicidade da bactéria, ou seja, a passagem direta de uma célula a outra, evitando assim os mecanismos de defesa do hospedeiro. Portanto, uma eficiente defesa imune é necessária para combater a infecção causada pela *Listeria*, função que é realizada pelos linfócitos T e os macrófagos ativos (PORTNOY, 1992; KAUFMANN, 1993).

### 2.6.3 – Evolução dos genes de virulência de *Listeria* spp.

Durante a evolução do gênero *Listeria* spp, alguns eventos de aquisição e perda de alguns genes foram cruciais na determinação de sua estrutura atual. A análise filogenética baseada na seqüência de 16S e 23S rRNA indica que o gênero compreende dois ramos de descendência: num deles esta a *L. grayi*, que corresponde ao antecessor de *Listeria* que durante a evolução nunca adquiriu genes de virulência, e na outra ramificação as demais espécies do gênero, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* que correspondem ao antecessor de *Listeria* após a aquisição e estabilização dos genes de virulência. *L. innocua* e *L. welshimeri* sofreram deleção (adquiriram apenas parte) e *L. seeligeri* com inativação funcional dos genes (Figura 4).

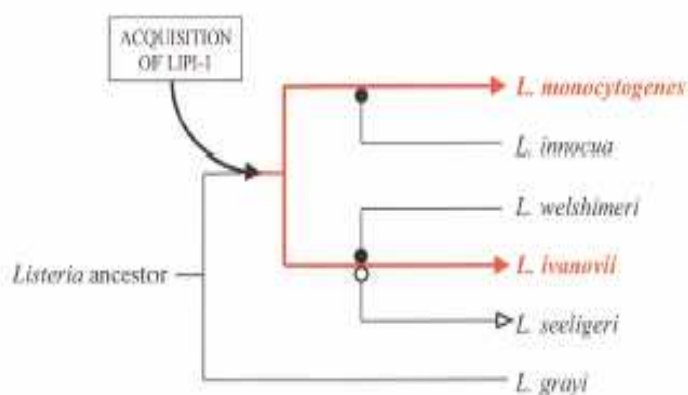


Figura 4. Filogenética do gênero *Listeria* e modelo de evolução da LIPI-1. As linhas em vermelho indicam a aquisição e conservação da função da LIPI- 1, os círculos fechados correspondem à perda da LIPI-1 nas espécies não patogênicas *L. innocua* e *L. welshimeri* e o círculo aberto, corresponde a uma alteração na LIPI-1 encontrada na espécie não patogênica *L. seeligeri*.

Fonte: Adaptada de Vásquez-Boland, et al. (2001b).

A organização da estrutura dos genes de virulência (LIPI-1) de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* é idêntica, no entanto os genes homólogos correspondentes, apresentam grau de divergência de 73-78%, compatível com a

distância genética que separa as duas espécies, sendo esta diferença mais pronunciada no gene *actA*, das proteínas codificadas somente 34% são iguais nas duas espécies apesar de desempenharem a mesma função. Esses dados sugerem que o gene de virulência esteve presente no antecessor comum de *Listeria* spp. A espécie não patogênica *L. seeligeri* também possui esses genes, entretanto, eles não são ativos devido a inserção de *orfE* entre os genes *plcA* e *prfA*, o que interrompe a regulação da expressão do gene *prfA* (GOUIN et al, 1994). Nas outras três espécies do gênero, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*, o gene de virulência, esta totalmente ausente como mostra a Figura 5.

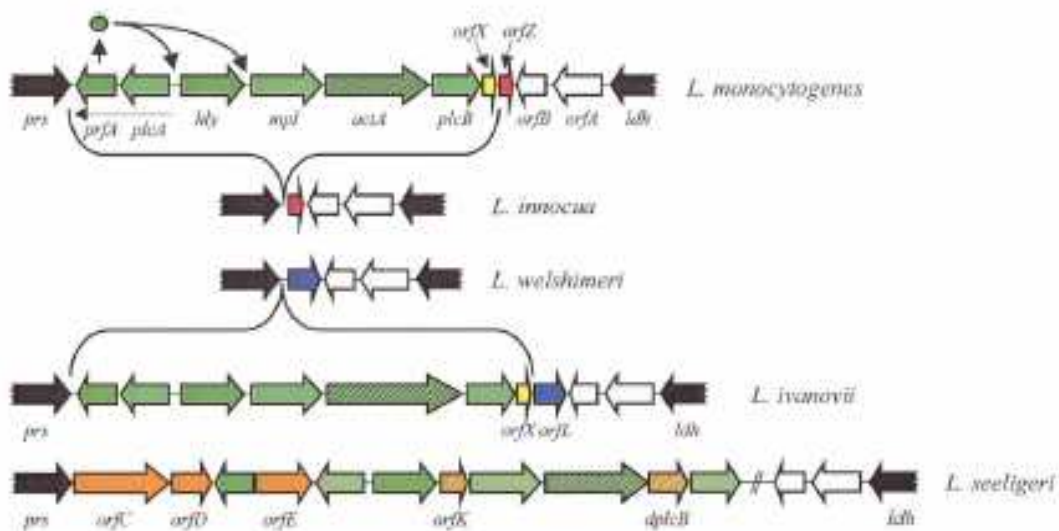


Figura 5. Estrutura genética da região cromossômica da LIPI-1 em *Listeria* spp. Os genes pertencentes à LIPI-1 estão em verde. Na região intergênica de *plcB-ldh* duas, ORFs, *orfA* e *orfB* são encontradas em todas *Listerias* spp, indicando que o ponto de inserção de LIPI-1 é entre *prs* e *orfB*.

Fonte: adaptada Vásquez-Boland, et al. (2001b).

## 2.6.4 – Internalinas

As internalinas constituem uma família de proteínas associadas aos genes virulentos encontrados em *Listeria* spp. patogênica. Os primeiros membros

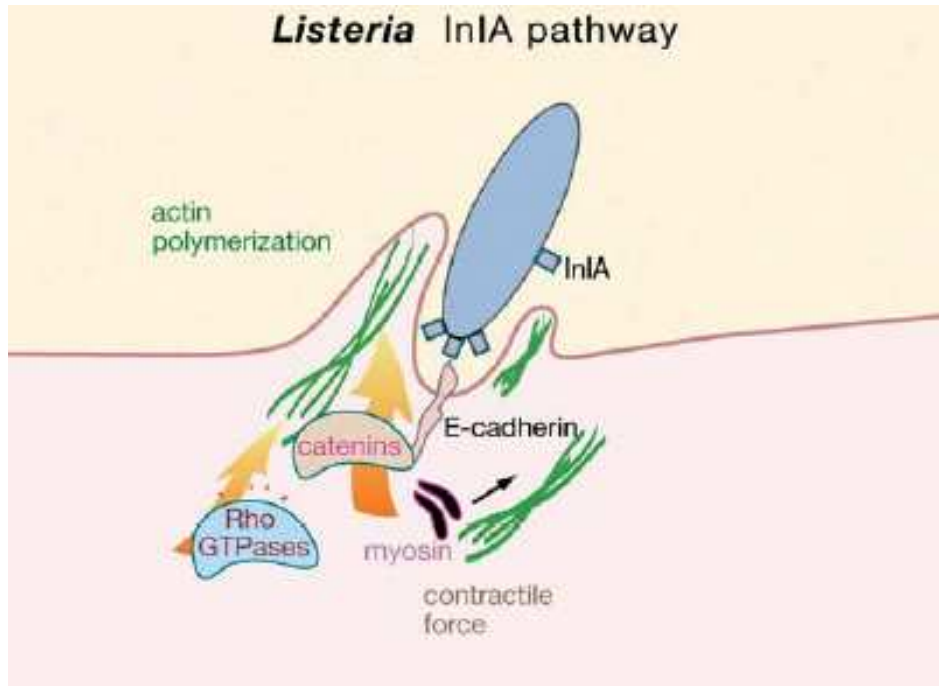


identificados foram as internalinas InIA e InIB, codificadas pelo operon *inIAB*, a partir dessas descobertas várias outras internalinas tem sido encontradas em *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Um elemento comum a todas as internalinas é uma seqüência de aminoácidos com resíduos de leucina em posições fixas, a qual é denominada LRR (*leucine – rich repeat*), que normalmente consiste de 22 aminoácidos com resíduos de leucina e isoleucina nas posições 3, 6, 9, 11, 16, 19 e 22 (VÁSQUEZ-BOLAND et al, 2001a).

As internalinas mais bem caracterizadas em termos de estrutura e função são InIA e InIB, além disso, segundo Cossart et al. (2003) são os dois principais fatores bacterianos que promovem a entrada da bactéria na célula hospedeira. Em culturas de células InIA é necessária para promover a entrada em células humanas epiteliais, não fagocíticas, como Caco-2 (LECUIT et al., 1997). A InIA está presente em todos os sorovares de *L. monocytogenes*, para a internalização da bactéria a InIA se liga a E-cadherin, uma proteína encontrada na superfície de algumas células epiteliais. Extracelularmente, E-cadherin assegura a adesão a células epiteliais vizinhas e intracelularmente, é ligada ao citoesqueleto de actina. O mecanismo de entrada na célula hospedeira ainda não está totalmente entendido, mas sabe-se que o complexo formado entre E-cadherin,  $\alpha$ -catenin e  $\beta$ -catenin é fundamental para a adesão intracelular e entrada de *L. monocytogenes* na célula hospedeira como demonstrado na Figura 6 (SCHUBERT et al., 2002; HAMON et al., 2006; PIZARRO-CERDÁ; COSSART, 2006).

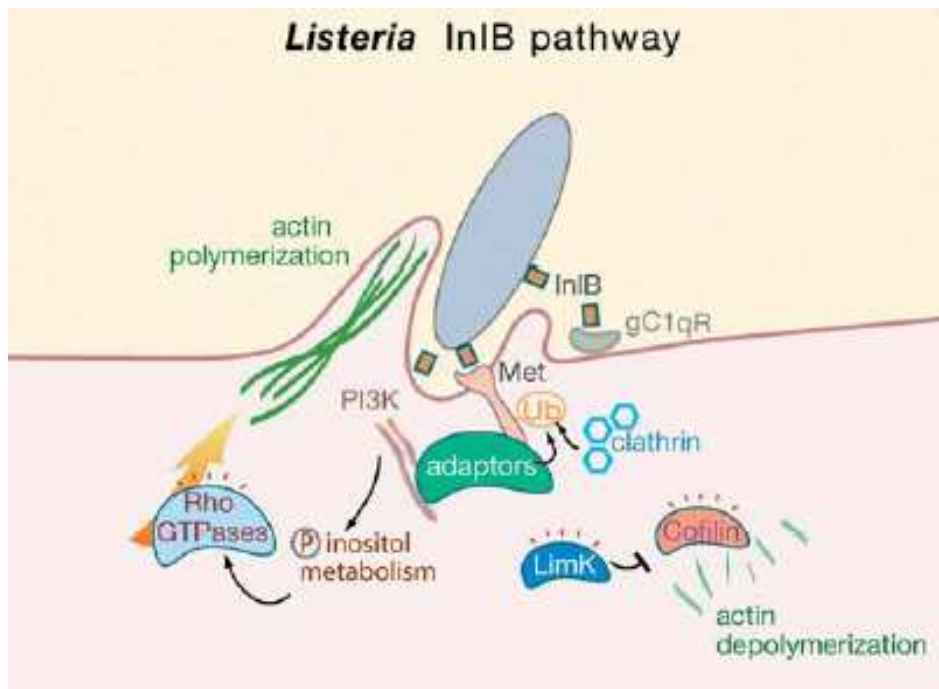
A InIB é responsável por intermediar a entrada da bactéria em vários tipos de células, entre elas, células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos e células endoteliais de várias espécies animais. Met é o receptor da internalina InIB nestas células, Met se liga a alguns fatores moleculares (*molecular adaptors*) que irão estimular a polimerização da actina como mostra a Figura 7 (PARIDA et al., 1998; IRETON., 2007;).

Estudo feito por Lecuit et al. (1997), comprovou que as internalinas InIA e InIB são necessárias e suficientes para promover a entrada na célula hospedeira.



Fonte: adaptada Pizarro- Cerdá e Cossart (2006).

Figura 6. Internalização através de InIA.



Fonte: adaptada Pizarro- Cerdá e Cossart (2006).

Figura 7. Internalização através de InIB.

## 2.7- Caracterização Molecular

Além dos métodos bioquímicos tradicionais, técnicas moleculares podem ser utilizadas na caracterização das linhagens e das espécies de microrganismos, dentre eles, *Listeria* spp. Podendo, serem usadas como ferramenta em estudos epidemiológicos. Além disso, as técnicas moleculares são consideradas mais rápidas e precisas em comparação com os métodos bioquímicos, o que é extremamente importante tratando-se de alimentos, que muitas vezes possuem curta vida de prateleira, e de microrganismos patogênicos como *Listeria* sp.

Na caracterização do gênero *Listeria* sp. alguns métodos moleculares destacam-se como: Ribotipagem (PIMENTA et al., 1999; LEITE et al., 2006); Eletroforese em Gel com Campo Pulsado (PFGE) que é, considerada, uma técnica de fácil interpretação e boa caracterização de *L. monocytogenes* (DESTRO et al., 1996; GRAVESEN et al., 2000); A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação *in vitro* de segmentos de DNA utilizando *primers*, que correspondem a regiões gênicas específicas, que serão estudadas, possui bom nível de diferenciação entre as linhagens de *L. monocytogenes* (CARMINATI et al., 2004); A técnica de Análise por Enzimas de Restrição (REA) consiste na amplificação de uma região gênica por PCR, seguido pela clivagem, em região específica do DNA a ser estudado, com enzima de restrição adequada. É considerado, um método simples e com boa reprodução, podendo ser um método útil para investigação epidemiológica da listeriose, segundo observação feita por Ericsson et al. (1995) em seu estudo com 133 linhagens de *L. monocytogenes*, sorovar 4b, utilizando a enzima de restrição *AluI* e o intervalo entre os genes *inIA* e *inIB*. Outra técnica bastante utilizada é a Amplificação Randômica de DNA polimórfico (RAPD). Este método utiliza a amplificação de segmentos de DNA com *primer* único, de seqüência de nucleotídeos arbitrária. É considerada, uma técnica fácil, rápida, com boa capacidade de diferenciação intra – espécies (FARBER; ADDISON, 1994; DESTRO et al., 1996). Usado em várias pesquisas para caracterizar linhagens de *L. monocytogenes*, observando sua origem, foco de contaminação e estudo epidemiológico (GIOVANNACCI et al., 1999; AGUADO et al., 2004; CABRITA et al., 2004). O uso combinado das técnicas de RAPD e REA foi

demonstrado por Aguado et al. (2004) para subtipagem de *L. monocytogenes* utilizando amostras de vegetais congelados e maquinário, para o isolamento da bactéria. Dos isolados, 11 linhagens foram encontradas e analisadas, com o objetivo de identificar a origem da contaminação, bem como, suas possíveis rotas.

### **3 – OBJETIVOS**

#### **3.1 – Objetivo Geral**

O objetivo geral deste trabalho foi caracterizar linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos do Rio Grande do Sul pela utilização de Amplificação Randômica do DNA polimórfico (RAPD) e Análise com Enzimas de Restrição (REA), e observar o perfil de resistência antimicrobiana desses microrganismos frente a vários antimicrobianos.

#### **3.2 – Objetivos Específicos**

- Diferenciar linhagens de *Listeria monocytogenes* encontradas nos produtos lácteos no estado do RS;
- Observar o perfil de resistência antimicrobiana desses microrganismos;
- Traçar um perfil genotípico das linhagens;
- Correlacionar os resultados obtidos entre as duas técnicas utilizadas para a caracterização molecular: RAPD e REA.

#### 4 - MÉTODOS E RESULTADOS

A seção de materiais e métodos e a seção de resultados serão apresentadas a seguir na forma de um artigo científico. O artigo científico será submetido à publicação no periódico *Brazilian Journal of Microbiology* e intitulado “***Listeria monocytogenes* in dairy products use of RAPD, PCR-REA and antimicrobial resistance for molecular epidemiology**”. Este artigo apresenta os procedimentos moleculares e de resistência antimicrobiana utilizados para caracterizar as linhagens de *Listeria monocytogenes* isoladas de produtos lácteos.

#### 4.1 – ARTIGO CIENTÍFICO

### ***Listeria monocytogenes* in dairy products use of RAPD, PCR-REA and antimicrobial resistance for molecular epidemiology**

Fernanda De Nes<sup>1</sup>, Gustavo Riboldi<sup>4</sup>, Ana Paula Frazzon<sup>3</sup>, Pedro Alves d'Azevedo<sup>5</sup>, Jeverson Frazzon<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS;

<sup>2</sup> Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRGS.;

<sup>3</sup> Departamento de Microbiologia, UFRGS;

<sup>4</sup> Centro de Biotecnologia, UFRGS;

<sup>5</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, PCR-REA, RAPD, dairy products.

**\* Correspondence and reprints:**

Dr. Jeverson Frazzon

**jeverson.frazzon@ufrgs.br**

Centro de Biotecnologia/Campus do Vale - UFRGS

Bento Gonçalves Av., 9500 – Prédio 43431 - LBM (Lab. 209)

PO Box: 15005 – Porto Alegre/RS – Brazil

Phone: +5551 – 33086072

Fax: +5551 - 33087309

## INTRODUCTION

The genus *Listeria* is formed by six species, among them *Listeria monocytogenes* is known as one of the main pathogenic specie in human beings (22). They are rods of gram-positive, non-spore, facultative anaerobes, which are capable of growing up in adverse conditions like low temperatures, pH acid, high salt concentration, procedures which are applied by the food industry to halt the growth of pathogenic microorganisms (9). Due to its ubiquitous nature, it can be constantly isolated from decomposing material, soil, water and in that way it can contaminate raw foods and through the cross-contamination others products like cheese and dairy products, meat products, fishes, ready-to-consume products which sometimes will be consume without previous thermal treatment (8).

Listeriosis is caused by the ingestion of contaminated food; it reaches mainly individuals with the immune system at risk like pregnant women, newborn infants, elderly people, diabetics, and cancer and AIDS sufferers (16). It is considered a grave disease, causing meningitis, septicemia, encephalitis, spontaneous miscarriage, stillbirth and others infections in the central nervous system. The mortality rate can reach to 30% even using appropriate antimicrobial treatment (20).

In general, the majority of strains of *L. monocytogenes* isolated from clinical samples, from food and from the environment, it is susceptible to active antimicrobials against gram-positive bacteria, and the chosen treatment is the combination of ampicillin with an aminoglycoside normally gentamicin (24). Although all the 13 serovars of *L. monocytogenes* are capable of provoking listeriosis, nearly 95% of the infection cases in humans are caused by three serotypes 1/2a, 1/2b and 4b, in relation to the food isolated samples, the main serovars found belong to the antigenic group 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c) (3). In Brazil, in one research carried out by Hofer *et al.* (13) show the serovar 1/2a predominated in dairy products.

Bacterial virulence depends on its ability to invade and multiply inside the host cell, among its virulent factors the InIA and InIB internalins (codified by *inIA* and *inIB* genes) have the essential role to *L. monocytogenes* invade the epithelial cells (11). Molecular techniques are excellent tools for the characterization of microorganisms, epidemiologic studies and differentiation between species. They are considered faster and more accurate comparing to biochemical methods. Among these techniques Polymorphic DNA Random Amplification (RAPD) and Restriction



Enzymatic Analysis (PCR-REA) are considered efficient methods for characterization of *L. monocytogenes* (6, 10).

The aim of this work was to increase the information in relation to *L. monocytogenes* bacteria existing in Brazil and in the Rio Grande do Sul State. Molecular techniques, RAPD and PCR-REA were used to analyze and characterize 19 isolated stocks of dairy products in Rio Grande do Sul State. Furthermore, it was observed the antimicrobial resistant profile of those microorganisms in front of various antimicrobials.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and DNA extraction**

Nineteen strains used in the present study were isolated from dairy products and provided by National Laboratory of Agropecuary in Porto Alegre (LANAGRO/RS) (Table 2). The 19 strains contained 8 strains of serovar 1/2b, 8 strains of 4b, 2 strains of 1/2a and one strain of serovar 4c. Serovar of the strains were determined on Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil. In order to analyze the morphology and confirm the colony purity, cells were grown in Listeria Enrichment Broth (LEB; Acumedia) for 18 hours at 37°C on shaker and isolated on solid media (LEB, 1,5 % ágar-ágar). Cells were stored at – 70°C in glycerol. Isolated strains have been the chromosomal DNA extracted as described by Torres *et al.* (21).

### **Antimicrobial susceptibility test**

All antimicrobial susceptibility tests was carried out using the standard disk diffusion method recommended by the NCCLS/CLSI (4), guidelines, using ampicillin, gentamicin, vancomycin, ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol and imipinem. All other antimicrobial agents tested had no standardized breakpoints for *Listeria* spp., so those established for *Staphylococcus* spp were used (4).

### **PCR-REA of the genes *inlA* and *inlB* Analysis**

The procedure described is based on the method by Ericsson *et al.* (6) consists of the amplification of a 2.916 pb fragment containing parts of *inlA* and *inlB* genes, associated with *Listeria monocytogenes* virulence, and on further restriction of this

fragment with the endonuclease *AluI*. PCR was performed using the primer A (5' CGACAACATTTAGTGAACCGTG 3') and the primer B (5' GCTGCTTTCGTCCAACCAATGAA 3') synthesized from Invitrogen Brazil, Ltd. Amplifications were carried out as previous described by Giovannacci *et al.* (10) using the enzymes *AluI* and *EcoRI*. Each sample was analyzed by gel electrophoresis in 2.0% agarose stained with ethidium bromide ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), observed in UV transillumination and photographed using Kodak Digital Science™ DC120.

### **RAPD Analysis**

Two primers used in this study, UBC127 (ATCTGGAGC) and UBC155 (CTGGCGGCTG) were designed according to Farber and Addison (7) and synthesized from Invitrogen Brazil, Ltd. Amplifications were carried out as previous described these authors. All PCR amplification was performed in final volume of  $25\mu\text{L}$  containing: 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 1  $\mu\text{M}$  of each primer and 1.25 U of *Taq* DNA polymerase. A Thermal Cycler (MJ Research, Inc. PTC-100) was utilized to PCR reaction. The cycling parameters used were: one cycle at  $94^\circ\text{C}$  for 2 min followed by 35 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 1 min,  $35^\circ\text{C}$  for 1 min, and  $72^\circ\text{C}$  for 2.5 min, with a final extension of 5 min at  $72^\circ\text{C}$ . PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1.5% agarose stained with ethidium bromide ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), observed in UV transillumination and photographed using Kodak Digital Science™ DC120.

### **Data Analysis**

The obtained results in the RAPD analysis were examined by SPSS program. The similarity between isolates was calculated by the simple association coefficient and the grouping analysis by UPGMA ("Unweight Pair Group Using Average "). The presence or absence of bands generated by RAPD was considered an alternative characteristic and it was codified as 1 or 0 respectively.

## RESULTS

### Antibiotic susceptibility test

None of all nineteen *L. monocytogenes* strains analyzed was resistant to the antimicrobial tested (ampicillin, gentamicin, vancomycin, ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol and imipinem) only one of the isolates (A49) presented reduced susceptibility to ciprofloxacin antimicrobial (Table 1).

Table 1 – In vitro susceptibility for the *L. monocytogenes* isolates (n = 19)

Drug testeds	Susceptible isolates/total strains (%) <sup>*</sup>
Ampicillin	19/19 (100)
Gentamicin	19/19 (100)
Vancomycin	19/19 (100)
Ciprofloxacin	19/18 (95)
Erythromycin	19/19 (100)
Tetracycline	19/19 (100)
Chloramphenicol	19/19 (100)
Imipinem	19/19 (100)

\* Based on a published Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS document and using staphylococcal interpretative criteria (4).

### PCR-REA Analysis of the genes *inlAB*

DNA fragment of 2916 bp obtained from amplification of genome DNA of *L. monocytogenes* using the primer A (5' CGACAACATTTAGTGAACCGTG 3') and the primer B (5' GCTGCTTTCGTCCAACCAATGAA 3') that correspond for internal region of genes *inlAB* was cleavage with restriction endonucleases *EcoRI* and *AluI*.

Cleavage using the restriction enzyme *EcoRI* produced three fragments that correspond size 500, 850 and 1600 pb it was observed that all the samples analyzed present the same profile, even the control sample ATCC7645, as it is shown in Figure 1.

Using the enzyme of restriction *A**l**u**I* in the cleavage of the product of PCR obtained by amplification of *in**I**A* and *in**I**B* regions it was observed that the samples analyzed were divided in 3 different profiles. The majority strains (17) presented p1 profile, p2 profile appeared only just in one of the strains studied (A45); p3 profile was observed in the control strain ATCC7645 and strain (A46) as it is show in Figure 2 and Table 2.

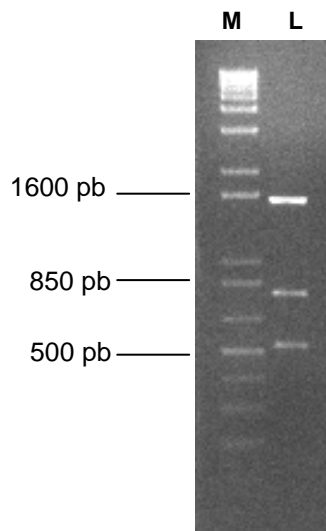


Fig. 1. PCR-REA profiles of *L. monocytogenes* by cleavage with *Eco**R**I*

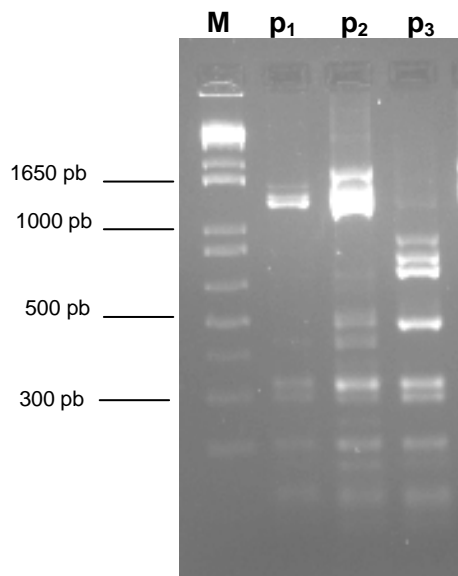


Fig. 2. PCR-REA profiles of *L. monocytogenes* by cleavage with *AluI*

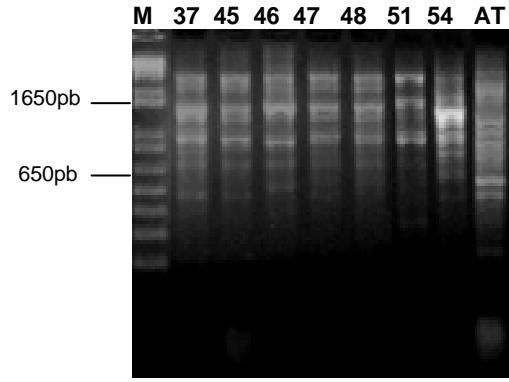
Table 2 - The serovar of *L. monocytogenes* and REA profile obtained with enzyme *AluI*

Strain	Serovar	PCR-REA - <i>AluI</i>
A32	1/2b	p1
A33	1/2b	p1
A34	1/2b	p1
A35	1/2b	p1
A36	1/2b	p1
A37	1/2b	p1
A38	1/2b	p1
A39	1/2b	p1
A40	4b	p1
A42	4b	p1
A43	4b	p1
A45	4b	p2
A46	4c	p3
A47	4b	p1
A48	4b	p1
A49	4b	p1
A50	4b	p1
A54	1/2a	p1
A55	1/2a	p1
ATCC7645 *	1/2a	p3

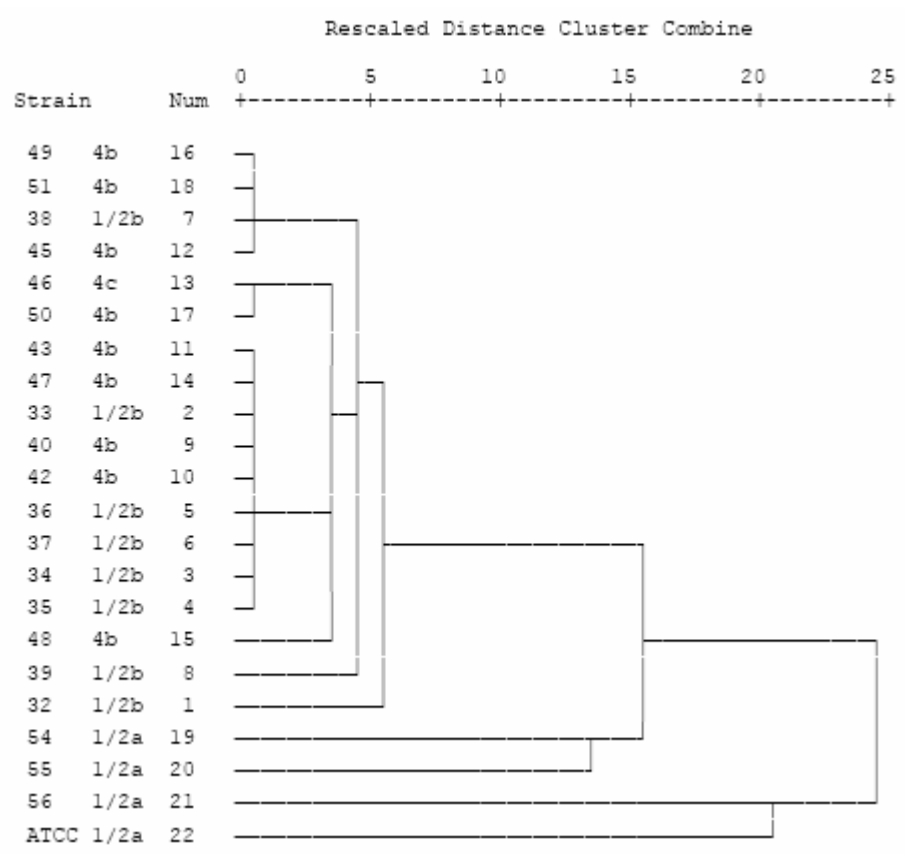
\* Reference strain

## RAPD analysis

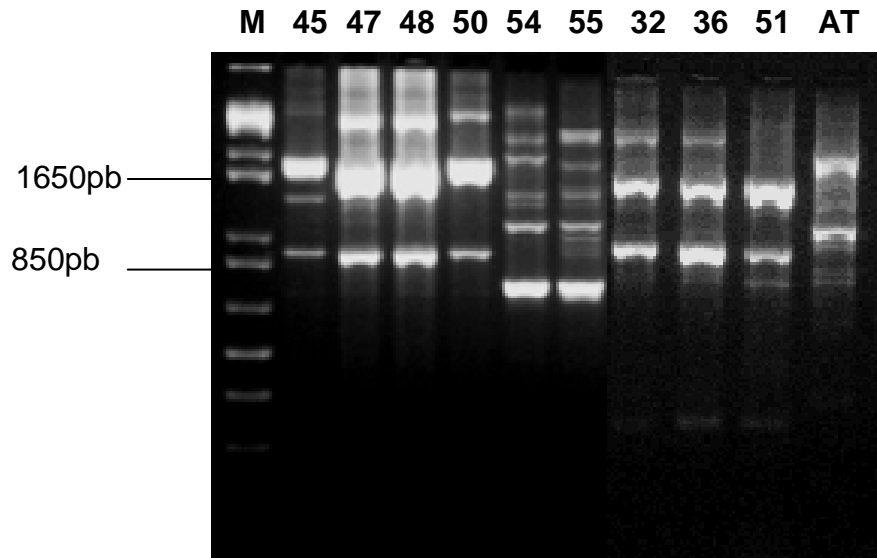
Two different primers (UBC 127 and UBC 155) were used for the analysis of RAPD from the isolates of *L. monocytogenes*. The reproduction of RAPD was assessed by the execution of, at least, three independent trials. The low intensity of the bands as well as the bands which were not consistently reproducible, were not considered when the RAPD patterns were analyzed. Amplifications in the negative control were not detected (water instead of lysate cell) confirming the absence of contaminations. The UBC 127 primer produced from 3 to 5 bands, with the molecular size of 450 pb to 2500 pb as shown in Fig. 3. The profiles of UBC 127 primer are shown in dendrogram Fig. 4. The studied strains of *L. monocytogenes* can be divided into three mainly clusters, with similarity level around 0.74. The first cluster included all the strains serovars 1/2b, 4c and 4b, which were divided into three subgroups. The second one included the only two strains of *L. monocytogenes* isolated from dairy products serovar 1/2a. The third cluster separated the two control strains (A56 and ATCC 7645) serovar 1/2a, from the others studied strains. It was also observed that the band of highest molecular size 2.5Kb was reproduced in all the isolates of dairy products except in strain 39, while molecular band 1.5KB size was reproduced in all the isolated strains of dairy products excepting in 1/2a serovars. The UBC 155 primer produced 3 to 6 bands with molecular sizes of 250 pb to 4250 pb as shown in Fig 5. Analyzing the dendrogram shown in Fig. 6, we can divided the strains into three mainly groups with similarity level around 0.75. The first cluster involves all the strains of *L. monocytogenes* serovars 1/2b, 4b and 4c, this cluster can even be divided into 4 subgroups. The second group is formed by strains serovar 1/2a (2 isolates from dairy products and the other used as a control one). The strain ATCC 7645 (serovar 1/2a) represents the third cluster, with similarity lever lower than the others samples, around 0.75. By using the two primers, analyzing the dendrogram show in Fig. 7, the strains, also, were divided into three mainly clusters. From the studied strains, seven (A33, A34, A35, A37, A40, A42 and A43) presented identical profiles in the two analyzed primers.



**Fig. 3** RAPD typing of the *L. monocytogenes* strains with primer UBC 127, AT=ATCC 7645. serovar 1/2b (37), serovar 4b (45, 47 and 48), serovar 4c (46), and serovar 1/2a (51, 54 and reference strain ATCC 7645).

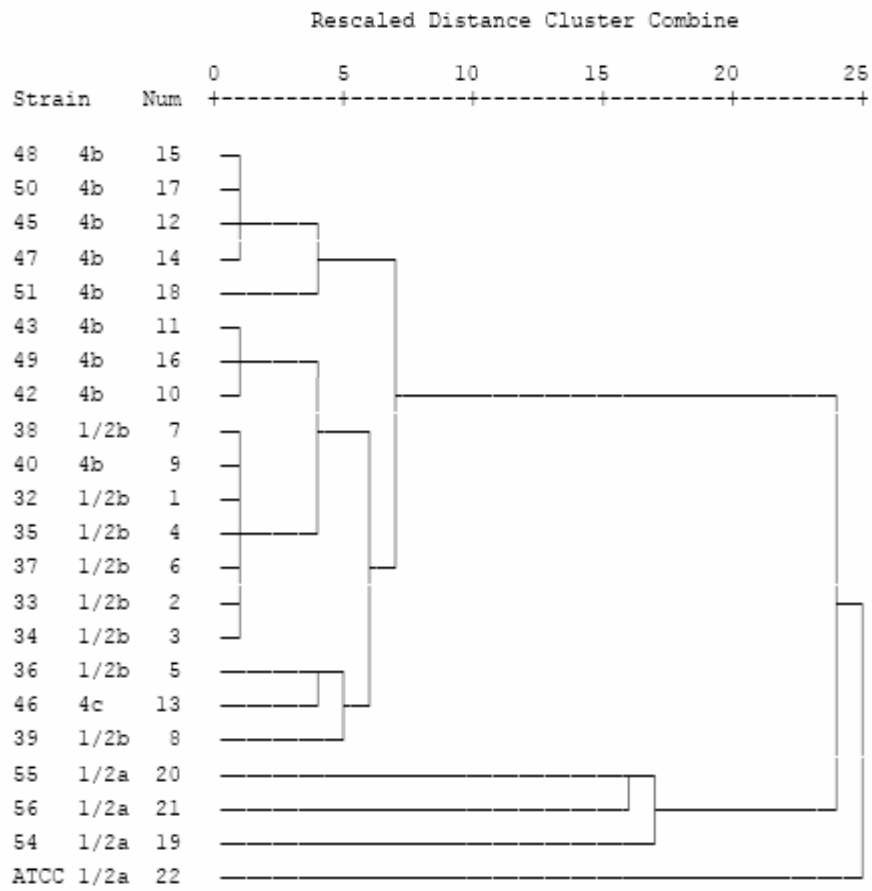


**Figure 4.** Dendrogram of *Listeria monocytogenes* RAPD for isolates and reference strain ATCC 7645 using primer UBC127 and serovar discrimination.

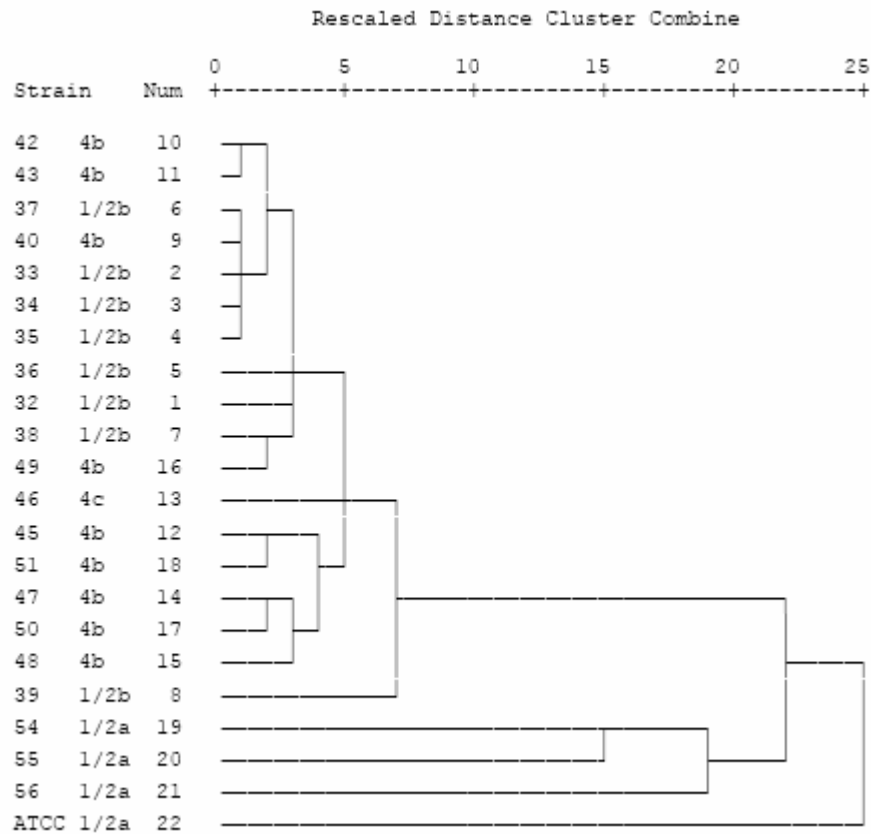


**Fig.5** RAPD typing of the *L. monocytogenes* strains with primer UBC 155, AT=ATCC 7645. serovar 1/2b (32, 36), serovar 4b (45, 47, 48 and 50) and serovar 1/2a (51, 54, 55 and reference strain ATCC 7645).





**Figure 6.** Dendrogram of *Listeria monocytogenes* RAPD for isolates and reference strain ATCC 7645 using primer UBC 155 and serovar discrimination.



**Figure 7.** Dendrogram of *Listeria monocytogenes* RAPD for isolates and reference strain ATCC 7645 using two primers and serovar discrimination.

## DISCUSSION

Listeriosis is a grave and severe disease caused by *L. monocytogenes* microorganism. The main source of transmission is the ingestion of contaminated food. Among this food it can be mentioned chiefly the dairy products which have been responsible for outbreaks of listeriosis (8). In Brazil, there is no plenty of information in relation to Listeriosis, especially because there are no official statistics about the disease due to the fact that its notification is not compulsory. Outbreaks were not yet reported, only some isolated case accounts (14).

The chosen treatment for listeriosis is the administration of penicillin or ampicillim associated with an aminoglycoside, usually gentamicin. For patients who are allergic to penicillin the treatment is performed successfully using a combination of vancomycin and an aminoglycoside or sulfamethoxazole-trimetropim (TMP-SMX) in

association with rifampicin. The use of cephalosporin is not suggested because strains of *L. monocytogenes* are normally resistant to those antimicrobials. (18, 20). In 1988, the first strain of *L. monocytogenes* multi-resistant to antimicrobials was isolated from human clinic material in France. The resistance was the result of the plasmidial transfer which origin is believed to be enterococci-streptococci (12). The incidence of resistance among isolates is low, therefore, a research was carried out by Srinasan *et al.* (19); isolated strains of *L. monocytogenes* from a dairy farm were resistant to various antimicrobials like ampicillin and rifampicin. In the present study, it was not nearly found resistance among *L. monocytogenes* isolated strains of dairy products, only one isolate presented intermediate susceptibility to ciprofloxacin antimicrobial. In research conducted by Arslan and Özdemir, (2), 47 strains of *Listeria* spp. isolated from homemade white cheese offered resistance to antibacterial penicillin, chloramphenicol and clarithromycin. However, all isolates were sensitive or they presented intermediate susceptibility to ampicillin, gentamicin, ciprofloxacin, rifampicin and sulfamethoxazole-trimetropim. These results agree with the results obtained in the present study excepting the antimicrobials that showed resistance and those which were not tested like rifampicin and sulfamethoxazole-trimetropim. In Brazil, one study performed with 13 samples of *L. monocytogenes* isolated from 12 clinic cases of listeriosis which happened in the southwestern region of Sao Paulo city, during the period of January 1995 and May 2005. It was used micro-dilution method showing that none of the clinic isolates presented resistance to antimicrobial ampicillin, gentamicin, trimethoprim and vancomycin except seven strains which had reduce sensibility to sulfamethoxazole (15). The *inlA* and *inlB* genes have essential role in the virulence of *L. monocytogenes* because they codify two proteins found in the cell surface which are related to the invasion of epithelial cells. Different authors have made discrimination of *L. monocytogenes* strains, even on the same serovar by PCR-REA, based on the polymorphism existing inside *inlA* and *inlB* genes using restriction enzyme *AluI*. In one study carried out by Ericsson *et al.* (6) with 133 strains of *L. monocytogenes* serovar 4b, isolated from food, animals, humans and from the environment, it was possible to distinguish the strains into two groups, group I containing 37 strains and the group II with 96 strains. Giovannacci *et al.* (10), applying the same technique in 287 isolated serovars 1/2a, 3a, 1/2c e 3c, put together isolates into two clusters. Cabrita *et al.* (3) implemented the same method in 39 strains of *L. monocytogenes* serovars 1/2a, 4a, 1/2b, 3b e 4b, isolated from raw

milk and smoked meat, they obtained three different profiles. In this work, using the aforementioned technique in the analysis of 19 isolates from dairy products, three profiles were found by use of restriction endonuclease *AluI*: p1 (including strains of serovars 1/2a, 1/2b and 4b), p2 (strain serovar 1c) and p3 (strain serovar 4c and control strain ATCC 7645). This result points out the low degree of polymorphism in *inIA* and *inIB* regions that it have been already shown in previous aforementioned studies by Ericsson *et al.* (6); Cabrita *et al.* (3) and Giovannacci *et al.* (10). This fact was already observed in others genic regions associated with *L. monocytogenes* virulence like *hly* gene (17) and with *mpl*, *prfA* and *iap* genes (23).

The Polymorphic DNA Random Amplification technique (RAPD) uses the amplification of the DNA segments with only one primer, of random nucleotides sequence. It is considered an easy, quickly, with good capacity of differentiation intra-species technique (5, 7).

The aforementioned technique has been used in several researchs to characterize strains of *L. monocytogenes*, observing their origins, contamination focus and epidemiologic study (1, 3, 10). The primers used in this study (UBC127 and UBC 155) presented good power of discrimination among the isolates strains, it was observed that the 1/2a and 1/2b serovars presented a great variety of molecular types suggesting an ample diversity among the isolates of those serovars. Being the analysis of RAPD base on the use of primers of random sequence, these results point out a high level of polymorphism among the serovars 1/2a and 1/2b. This fact was already observed in research carried out by Cabrita *et al.* (3) which used in RAPD technique the primers UBC155, UBC156 and UBC157, to analyze 39 strains of *L. monocytogenes* isolated from raw milk, smoked meat, chicken carcass, belonging to serovars 1/2a, 4a, 1/2b, 3b and 4b. The primers used in the present study were applied by Destro *et al.* (5) to trace *L. monocytogenes* contamination in a shrimp processing factory. They concluded that the cited technique can be used to trace the contamination by *L. monocytogenes* in food processing factories. The results obtained, using the two molecular techniques in this work (REA and RAPD), show a low grade of diversity among the studied strains of *L. monocytogenes*, which were isolated from dairy products of the south of Brazil.

## References

- 1 -Aguado, V.; Vitas, A.I.; García-Jalón, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *Intern. Journal of Food Microbiology*, 90:341-347, 2004.
- 2 - Arslan, S.; Özdemir, F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. In homemade white cheese. *Food Control*, 19:360-363, 2008.
- 3 - Cabrita, P.; Correia, S.; Ferreira-Dias, S.; Brito, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic Applied Microbiology*, 27: 454 -461, 2004.
- 4 – National Committee for Clinical Laboratory Standards/CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twelfth Informational Supplemente. (2002). CLSI/NCCLS document M100 – S12. CLSI, Wayne, PA., USA.
- 5 - Destro, M.T.; Leitão, M.F.F.; Farber, J.M. Use of Molecular Typing Methods To Trace the Dissemination of *Listeria monocytogenes* in a Shrimp Processing Plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2):705-711, 1996.
- 6 - Ericsson, H.; Stalhandske, P.; Danielsson-Tham, M.L.; Bannerman, E.; Bille, J.; Jacquet, C.; Rocourt, J.; Tham, W. Division of *Listeria monocytogenes* Serovar 4b Strains into Two Groups by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11): 3872-3874, 1995.
- 7 - Farber, J.M.; Addison, C.J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 77:242-250, 1994.
- 8 - Farber, J.M.; Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55(3): 476-511, 1991.
- 9 - Gandhi, M. Chikindas, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1-15, 2007.
- 10 - Giovannacci, L.; Ragimbeau, C.; Queguiner, S.; Salvat, G.; Vendeuvre, J-L.; Carlier, V.; Ermel, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*, 53:127-140, 1999.
- 11 - Hamon, M.; Bierne, H.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 423-434, 2006.

- 12 - Hansen, J.M.; Gerner-Smidt T, P.; Bruun, B. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. *APMIS*, 113: 31-36, 2005.
- 13 - Hofer, E.; Ribeiro, R.; Feitosa, D.P. Species and serovars of the Genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95(5): 615-620, 2000.
- 14 - Hofer, E.; Nascimento, R.S.; Oliveira, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(2):173-177, 1998.
- 15 - 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*, 38:287-292, 2007.
- 16 - Low, J.C.; Donache, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Veterinary Journal*, 153: 9-29, 1997.
- 17 - Rasmussen, O.F.; Beck, T.; Olsen, J.E.; Dons, L.; Rossen, L. *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. *Infect. Immun.* 59:3945-3951, 1991.
- 18 - Schlech, W.F. Foodborne listeriosis. *Clinical Infection Disease*, 31:770-775, 1998.
- 19 - Srinivasan, V., Nam, H.M., Nguyen, L.T., Tamilselvam, B., Murinda, S.E.; Oliver, S.P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2(3):201-211, 2005.
- 20 - Swaminathan, B.; Gerner-Smidt, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection*, 9:1236-1243, 2007.
- 21 - Torres, K.; Poutou, R.; Carrascal, A.; Sierra, S.; Mercado, M. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *MVZ-Córdoba*, 9(2):414-427, 2004.
- 22 - Vázquez-Boland, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Bernal, G.D.; Goebel, W.; Zorn, G.B.; Wehland, J.; Kreft, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3): 584-640, 2001.

23 - Vines, A.; Reeves, M.W.; Hunter, S.; Swaminathan, B. Restriction fragment length polymorphism in four virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes*. *Res. Microbiol.* 143:281-294, 1992.

24 - White, D.G.; Zhao, S.; Simjee, S.; Wagner, D.D.; McDermott, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. *Microbes and Infection*, 4(4): 405-412, 2002.

## 5. CONCLUSÕES

**a.** O perfil de susceptibilidade antimicrobiana foi similar a outros estudos, visto que, a incidência de resistência entre os isolados, normalmente, é baixa. Todas as linhagens de *L. monocytogenes* analisadas foram sensíveis aos antimicrobianos testados, com exceção de uma das linhagens que apresentou susceptibilidade reduzida ao ciprofloxacino.

**b.** Na técnica de REA a enzima de restrição *AluI* apresentou maior eficiência na caracterização das linhagens quando comparada a enzima *EcoRI*.

**c.** As linhagens estudadas apresentaram baixo grau de polimorfismo na região gênica *inlA* e *inlB*.

**d.** A caracterização molecular utilizando a técnica de RAPD apresentou bom poder de discriminação entre as linhagens isoladas, observou-se que os sorovares 1/2a e 1/2b apresentaram uma grande variação de tipos moleculares, indicando alto grau de polimorfismo entre estes sorovares, fato já relatado na literatura.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUADO, V.; VITAS, A. I.; GARCÍA-JALÓN, I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.90, p.341-347, 2004.

BILLE, J; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria, Erysipelothrix, and Kurthia*. In: MURRAY, P. *et al.* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap. 22, 346-352.

CABRITA, P.; CORREIA, S.; FERREIRA-DIAS, S.; BRITO, L. Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v.27, p. 454 -461, 2004.

CAIN, D.B.; MCCANNT, V.L. An unusual case of cutaneous listeriosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.23, p.976-977, 1986.

CARMINATI, D.; PERRONE, A.; GIRAFFA, G.; NEVIANI, E.; MUCCHETTI, G. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Gorgonzola Cheese rinds. **Food Microbiology**, London, v.21, p.801-807, 2004.

COSSART, P.; PIZARRO-CERDA, J.; LECUIT, M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes* functional mimicry to subvert cellular functions. **Trends Cell Biology**, London, v.13, p.23-31, 2003.

DESTRO, M. T.; LEITÃO, M. F. F.; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, n.2, p.705-711, 1996.

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

ERICSSON, H.; STALHANDSKE, P.; DANIELSSON-THAM, M.L.; BANNERMAN, E.; BILLE, J.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; THAM, W. Division of *Listeria monocytogenes* Serovar 4b strains into two groups by pcr and restriction enzyme analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.11, p. 3872-3874, 1995.

FARBER, J.M.; ADDISON, C.J. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v.77, p.242-250, 1994.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M.L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.113, p.1-15, 2007.

GIOVANNACCI, L.; RAGIMBEAU, C.; QUEGUINER, S.; SALVAT, G.; VENDEUVRE, J-L.; CARLIER, V.; ERMEL, G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.53, p.27-140, 1999.

GOUIN E.; MENGAUD J.; COSSART P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovi*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species, **Infection Immunology**, Washington, v.62, p.3550-3553, 1994.

GRAVESEN, A.; JACOBSEN, T.; MOLLER, P. L.; HANSEN, F.; LARSEN, A. G.; KNOCHEL, S. Genotyping of *Listeria monocytogenes*: comparison of RAPD, ITS, and PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.57, p.43-51, 2000.

HAIN, T.; STEINWEG, C.; CHAKRABORTY, T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.126, p.37-51, 2006.

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

HANSEN, J. M.; GERNER-SMIDT, P.; BRUUN, B. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Denmark 1958-2001. **APMIS**, Copenhagen, v.113, p.31-36, 2005.

HOFER, C. B.; MELLES, C. E. A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplants recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.41, n.6, p.375-377, 1999.

HOFER, E; NASCIMENTO, R. S.; OLIVEIRA, M. A. Meningite por *Listeria monocytogenes*: relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

INOUE, S.; KATAGIRI, K.; TERAQ, M. & MARUYAMA, T. RAPD- and *actA* Gene-Typing of *Listeria monocytogenes* Isolates of Human Listeriosis, the Intestinal Contents of Cows and Beef. **Microbiology and Immunology**, Tóquio, v.45, p.127-133, 2001.

IRETON, K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. **Cellular Microbiology**, Berkeley, v.9, n.6, p.1365-1375, 2007.

JAY, M.J. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v.25, n.2, p.571-580, 2006.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Des Moines v.65, p.811-1829, 2002.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review Immunology**, Palo Alto, v.11, p. 129-163, 1993.

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

LECUIT, M.; OHAYON, H.; BRAUN, L.; MENGAUD, J.; COSSAT, P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact Leucine-Rich Repeat Region is sufficient to promote internalization. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, n.12, p.5309-5319, 1997.

LEITE, P.; RODRIGUES, R.; FERREIRA, M.; RIBEIRO G.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; BRITO, L. Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.106, p.111-121, 2006.

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**, São Paulo, v.38, p.287-292, 2007.

LOW, J.C.; DONACHE, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. **Veterinary Journal**, London, v.153, p.9-29, 1997.

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

MONNIER, A.L.; JOIN-LAMBERT, O.L.; JAUBERT, P.B.; KAYALI, S. Invasion of the placenta during murine listeriosis. **Infection and Immunity**, Washington, v.74, n.1, p.663-672, 2006.

PARIDA, S.K.; DOMANN, E.; ROHDE, M.; MÜLLER, S.; DARJI, A.; HAIN, T. et al. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. **Molecular Microbiology**, Salem, v.28, p.81-93, 1998.

PERRIN, M.; BEMER, M. & DELAMAREI, C. Fatal case of *Listeria innocua* Bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.11, p.5308-5309, 2003.

PIMENTA, F.C.; FURLANETTO, S.M.P.; MAYER, L.W.; TIMENETSKY, J.; SANTOS, M.A.A. Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.30, p.356-361, 1999.

PIZARRO-CERDÁ, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, Cambridge, v. 124, p 715-727, 2006.

PORTNOY, D.A. Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. **Current Opinion in Immunology**, Amsterdam, v.4, p.20-24, 1992.

ROBBINS, J.B.; FISCHER, C.W.; MOLTZ, A.G.; MARTIN, S.E. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.68, n.3, p.494-498, 2005.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, Guildford, GB, v.7, p.195-202, 1996.

SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a Comprehensive

Cancer Center (1955-1997). **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, n.1, p.483-485, 2003.

SCHLECH, W.F. Foodborne listeriosis. **Clinical Infection Disease**, Boston, v.31, p.770-775, 1998.

SCHUBERT, W.D.; URBANKE, C.; ZIEHM, T.; BEIER, V.; MARCHNER, 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**, Cambridge, v.111, p.825-836, 2002.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.2, p.111-114, 2003.

SCORTTI, M.; MONZO, H.J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D.A.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. The PrfA virulence regulon. **Microbes and Infection**, Paris, v.9, p. 1196-1207, 2007.

SILVA, L.J. et al. Listeriosis and AIDS: case report and literature review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v.34, n.5, p.475-478, 1992.

SILVER, H.M. Listeriosi during pregnancy. **Obstetrical Gynecological Survey** Guildford, v.53, p.737-740, 1998.

SNAPIR, Y.M.; VAISBEIN, E.; NASSAR, F. Low virulence but potentially fatal outcome – *Listeria ivanovii*. **European Journal of International Medicine**, v.17, p. 286-287, 2006.

SRINIVASAN, V., NAM, H.M., NGUYEN, L.T., TAMILSELVAM, B., MURINDA, S.E.; OLIVER, S.P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v.2, n.3, p.201–211, 2005.

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

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines v.65, n.4, p.709-725, 2002.

TROXLER, R.; VON GRAEVENITZ, A.; FUNKE, G.; WIEDEMANN, B.; STOCK, I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. gray*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* strains. **Clinical Microbiology Infection**, Paris, v.6, n.10, p.525-536, 2000.

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

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; BERNAL, G.D.; GOEBEL, W.; ZORN, G.B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, 2001a.

WALLS, I.; BUCHANAN, R. L. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**, Guildford, v.16, p.795-799, 2005.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SIMJEE, S.; WAGNER, D.D.; MCDERMOTT, P.F. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, n.4, p.405-412, 2002.