

**UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**Caracterização molecular, susceptibilidade  
a antibióticos e pesquisa de factores de  
virulência em *Listeria* spp. de alimentos e  
superfícies**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mafalda Pinheiro Alho**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2012**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL**



**Caracterização molecular, susceptibilidade  
a antibióticos e pesquisa de factores de  
virulência em *Listeria* spp. de alimentos e  
superfícies**

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Maria Leitão Semedo-Lemsaddek e  
pela Professora Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel

**Mafalda Pinheiro Alho**

**MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA**

**2012**



# **Caracterização molecular, susceptibilidade a antibióticos e pesquisa de factores de virulência em *Listeria* spp. de alimentos e superfícies**

**Mafalda Pinheiro Alho**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**2012**

Dissertação orientada pela Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek (Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar Secção de Tecnologia dos Produtos Animais, Avenida da Universidade Técnica – Pólo da Ajuda 1300-477 Lisboa) e pela Prof. Doutora Lélia Mariana Marcão Chambel (Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Campus da FCUL, 1749-016 Lisboa, Portugal).

“Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades e os obstáculos desaparecerem”

John Lennon

## **Agradecimentos**

Existiram pessoas que foram essenciais e sem elas não tinha sido possível a realização deste trabalho... Por isso agradeço:

À Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, pela orientação deste trabalho, pela paciência para os meus disparates e disponibilidade demonstrada, pelas críticas construtivas e partilha de conhecimentos que contribuíram bastante para o meu “crescimento” como estudante e também como pessoa.

À Professora Doutora Lélia Chambel, por se ter mostrado sempre disponível e pela presença ao longo do trabalho.

Foram as duas incansáveis, OBRIGADA!!!!

Aos colegas do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Secção de Tecnologia dos Produtos Animais. Ao Professor Doutor António Salvador Barreto, à Professora Doutora Maria João Fraqueza. À Engenheira Maria José Fernandes, Maria Helena Fernandes e à Dona Paula um agradecimento muito especial... À Ana Rita, Ana Martins, Irani Gouveia, e Marta pela presença como colegas e como amigas, sempre disponíveis para ajudar e partilhar bons momentos de descontração!

À Doutora Manuela Sol do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, ao Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo, ao Instituto Oswaldo Cruz e ao Hospital de Cascais Dr. José Almeida, por terem disponibilizado isolados para a criação da coleção *Listeria* spp. deste trabalho.

Às minhas companheiras de gabinete e laboratório, Cynthia, Sara Caveirinha e Verónica... Por tudo o que partilhamos e vivemos juntas, pelo ambiente agradável que proporcionamos umas às outras! Foram a cereja em cima do bolo!

À Caxopa ainda tenho a dizer que foi fundamental na “sobrevivência” desta nossa fase de vida... Por tudo, pelas gargalhadas, pelas lágrimas, pelos abraços, por andarmos sempre a “xerifar” o trabalho uma da outra, pelo apoio a nível pessoal e profissional, por estares sempre lá... Um obrigada muito especial!!!!

Aos meus “mais-que-tudo” da Amadora... Porque sempre poderei contar com vocês em todos os momentos da minha vida!

Aos amores da minha vida, Margarida, Joana e Sofia... Um obrigada muito muito especial, simplesmente por... TUDO!!!

Ao meu muxaxo por ser o meu companheiro, pela paciência por me aturar ao longo de todas as etapas da minha, por tornar todos os obstáculos mais fáceis... Enfim, por ser amor da minha vida, e por estar sempre lá!!!

Por último, mas não (DE TODO!!!) menos importante, aos meus Pápás! Amo-vos do fundo do coração!!!

## Abstract

Listeriosis is a great concern for public health due to its high fatality rates and *L. monocytogenes*, the species from the *Listeria* genus most commonly associated with this disease, is known to be disseminated through the food chain.

The present study began by gathering *Listeria* spp. from three distinct environments: a cheese making factory, a slaughterhouse and a supermarket. After sampling the cheese making factory seven *Listeria* spp. were obtained (two *L. monocytogenes* from serogroup 1/2a-3a), 15 *Listeria* spp. were isolated at the slaughterhouse (six *L. monocytogenes*: four from serogroup 1/2a-3a and two from serogroup 4b-4e-4ab) and 30 *Listeria* spp. at the supermarket (12 *L. monocytogenes*: nine from serogroup 1/2a-3a, two from serogroup 1/2c-3c and one from serogroup 4b-4e-4ab). Overall, all sampling sites harbored *L. monocytogenes* belonging to the most virulent lineages (I and II), pointing to a health risk associated with the environments under study.

To further assess the putative pathogenicity of the 52 *Listeria*, 13 clinical isolates (from Brazil, Denmark and Portugal) and 17 food isolates (from Spain and Portugal) were included in the present investigation for comparison purposes and all *Listeria* were analyzed regarding their antimicrobial susceptibility (to 11 antibiotics) and presence/expression of virulence factors (eg. *hlyA*, *plcA*, *inlA*, *inlC*, hemolysin, DNase).

The results showed the increase of resistance to two clinically relevant antibiotics for the treatment of listeriosis (ampicillin and penicillin) and revealed the existence of multiresistant isolates, findings which represent a high risk for human health. Regarding the virulence profiles observed, they varied from the detection of one virulence trait to the presence of all factors tested, suggesting different levels of virulence among the isolates being investigated.

Compilation of all the results obtained disclosed the occurrence of listeria isolates with high pathogenicity potential at all sampling sites, reinforcing the need for surveillance designed for detecting the presence of *Listeria* spp. in food products and food processing environments.

**Key words:** *Listeria* spp.; antimicrobial susceptibility; virulence factors; pathogenicity potential.

## Resumo

A listeriose humana é uma doença associada a elevadas taxas de mortalidade, possuindo assim um elevado impacto para a saúde pública. De todas as espécies pertencentes ao género *Listeria*, a mais comumente responsável por esta doença é *L. monocytogenes*, que se encontra altamente disseminada pela cadeia alimentar.

O presente estudo iniciou-se com a criação de uma coleção de isolados de *Listeria* recolhidos em três locais de amostragem (fábrica de queijos, matadouro de suínos e hipermercado). Assim, foram identificadas: sete *Listeria* spp. na fábrica de queijos (duas pertencentes à espécie *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a-3a); 15 *Listeria* spp. no matadouro (seis pertencentes à espécie *L. monocytogenes*, quatro do serogrupo 1/2a-3a e duas do serogrupo 4b-4e-4ab); e 30 *Listeria* spp. no hipermercado (12 pertencentes à espécie *L. monocytogenes*, nove do serogrupo 1/2a-3a, duas do serogrupo 1/2c-3c e uma do serogrupo 4b-4e-4ab). Portanto, em todos os locais amostrados foram detectados serogrupos de *L. monocytogenes* pertencentes às linhagens mais preocupantes (I e II), o que *per se* já demonstra um certo risco para a saúde pública.

Na tentativa de melhor averiguar o potencial de patogenicidade dos 52 isolados adicionaram-se à coleção 13 isolados clínicos (provenientes do Brasil, Dinamarca e Portugal) e ainda 17 isolados alimentares (isolados de peixe e queijo em Espanha e Portugal). Procedeu-se à análise da susceptibilidade a 11 antibióticos, bem como a avaliação da presença/expressão de factores de virulência (ex. *hlyA*, *plcA*, *inlA*, *inlC*, hemolisina, DNase).

Dos resultados obtidos é importante destacar a emergência de resistência a dois dos antibióticos habitualmente utilizados no tratamento da listeriose (ampicilina e penicilina) e a existência de isolados multirresistentes, o que representa um elevado risco para a saúde pública. Relativamente aos perfis de virulência observados, estes vão desde a deteção de pelo menos um factor de virulência à presença de todos os factores testados, o que sugere diferentes graus de risco entre os isolados em estudo.

A integração de todos os resultados obtidos permitiu avaliar que existem isolados com elevado potencial patogénico nos três locais amostrados, reforçando a necessidade de proceder à vigilância da presença de *Listeria* spp. em alimentos e ambientes em que os mesmos são processados e/ou comercializados.

**Palavras-chave:** *Listeria* spp.; susceptibilidade a antibióticos; factores de virulência; potencial de patogenicidade.

## Índice

1. Introdução .....	1
1.1. Características gerais do género <i>Listeria</i> .....	1
1.2. Potencial de patogenicidade.....	2
1.2.1. <i>Listeria</i> spp. no ambiente.....	4
1.2.2. Susceptibilidade a antibióticos.....	5
1.2.3. Factores de virulência.....	6
2. Materiais e Métodos .....	12
2.1. Recolha, processamento e isolamento.....	12
2.2. Identificação ao nível de género/espécie e tipificação por métodos moleculares.....	13
2.2.1. Identificação por métodos fenotípicos .....	13
2.2.2. Identificação por métodos moleculares .....	13
2.2.3. Tipificação por métodos moleculares .....	14
2.3. Potencial de patogenicidade.....	15
2.3.1. Susceptibilidade a antibióticos.....	15
2.3.2. Pesquisa de factores de virulência .....	15
2.4. Análise de dados .....	16
2.5. Disseminação de <i>Listeria</i> spp. nos locais de amostragem em estudo .....	17
2.6. Susceptibilidade a antibióticos.....	23
2.7. Factores de virulência .....	25
2.8. Potencial de patogenicidade.....	29
3. Conclusões.....	33
4. Referências .....	34
Anexo .....	39

## Índice de Figuras

Figura 1. Passos sucessivos da disseminação de <i>L. monocytogenes</i> por três barreiras: barreira intestinal, barreira hemato-encefálica e barreira materno-fetal, provocando listeriose humana (adaptado Cossart <i>et al.</i> , 2008).....	6
Figura 2. Representação do ciclo de infecção de <i>L. monocytogenes</i> (retirado de Cossart <i>et al.</i> , 2008).....	9
Figura 3. Organização física do <i>cluster</i> central de virulência e a estrutura do seu <i>locus</i> em algumas espécies de <i>Listeria</i> (retirado de Vázquez-Boland <i>et al.</i> , 2001).....	10
Figura 4. Esquema representativo dos passos efetuados na recolha, processamento e isolamento.....	12
Figura 5. Exemplo de reações de PCR-multiplex dos isolados em estudo.....	18
Figura 6. Dendrograma contendo todos os isolados da coleção <i>Listeria</i> spp. ....	21
Figura 7. Gráfico representativo do número de isolados resistentes, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22).....	23
Figura 8. Gráfico representativo do número de isolados resistentes de <i>Listeria</i> spp., segundo os breakpoints de CLSI, 2007, O'Connor <i>et al.</i> , 2010 e Acciari <i>et al.</i> , 2011.....	24
Figura 9. Gráfico representativo do número de isolados produtores de DNase, gelatinase, hemolisina, lipase e PC-PLC, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22), aos 11 antibióticos testados.....	25
Figura 10. Exemplo da reação de PCR-multiplex segundo Rawool <i>et al.</i> (2007) dos isolados testados neste estudo. ....	26
Figura 11. Gráfico representativo do número de isolados detentores dos genes de virulência <i>actA</i> , <i>hlyA</i> , <i>iap</i> e <i>plcA</i> , num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22). ....	27
Figura 12. Exemplo da reação de PCR-multiplex segundo Liu <i>et al.</i> (2007) dos isolados testados neste estudo. ....	28
Figura 13. Gráfico representativo do número de isolados detentores dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlC</i> e <i>inlJ</i> , num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22).....	28
Figura 14. Esquema representativo contendo a identificação dos isolados e as suas respectivas características, nomeadamente a expressão de atividades enzimáticas, a pesquisa de genes de virulência e a resistência a 11 antibióticos testados.....	30

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Reação de PCR-multiplex para identificação por métodos moleculares. ....	13
Tabela 2. Informação dos primers e das condições das reações PCR-fingerprinting e ERIC-PCR.....	14
Tabela 3. Antibióticos utilizados neste estudo.....	15
Tabela 4. Reações de PCR-multiplex utilizados na pesquisa de genes de virulência.....	16
Tabela 5. Presença de genes em análise para cada um dos serogrupos.....	17
Tabela 6. Número de isolados e sua identificação nos três locais de amostragem. ....	18
Tabela A 1. Informação mais detalhada das reações de PCR-multiplex para identificação por métodos moleculares e da pesquisa dos genes de virulência. ....	39
Tabela A 2. Informação sobre <i>breakpoints</i> de resistência definido por Acciari <i>et al.</i> , 2011; CLSI, 2007 e O'Connor <i>et al.</i> , 2010. ....	40
Tabela A 3. Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem na fábrica de queijos e sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica.....	41
Tabela A 4. Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem no matadouro de suínos e a sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica.....	42
Tabela A 5. Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem no hipermercado e a sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica. ....	43

## 1. Introdução

### 1.1. Características gerais do género *Listeria*

A descoberta oficial do género *Listeria* ocorreu por volta de 1924, quando Murray, Webb e Swanm isolaram *L. monocytogenes* como agente etiológico de uma septicemia que afetou coelhos e porquinhos-da-Índia no seu laboratório em Cambridge, Inglaterra. No entanto, a primeira cultura de *L. monocytogenes* registada, data de 1921, isolada por Cotoni e Dumont de um paciente com meningite (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

O género *Listeria*, pertencente à família *Listeriaceae*, engloba um grupo de bactérias intimamente relacionadas, gram-positivas, não-formadoras de esporos, em forma de bastonetes regulares isolados ou organizados em cadeias, com conteúdo de G+C relativamente baixo (36-38%), aeróbias facultativas. Sobrevivem e multiplicam-se dentro dos limites de temperatura 0-45 °C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento de 30-37 °C. Apresentam mobilidade entre 20-28 °C, através de flagelos peritríquios, perdendo a mesma a partir de 37 °C. Não sobrevivem a temperaturas de 60 °C por mais de 30 minutos. Em termos de resistência a diferentes gamas de pH, crescem entre intervalos de 6-9 e em concentrações a NaCl até 10% (p/v). São catalase positiva e oxidase negativa, hidrolisam a esculina mas não a ureia.

Este género é constituído por oito espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (possui duas subespécies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovvii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*), *L. grayi*, *L. marthii* e *L. rocourtiae* (J. P. Euzéby [<http://www.bacterio.cict.fr//listeria.html> Acedido em 13/07/2012]). Todas estas espécies são filogeneticamente muito relacionadas, com exceção de *L. grayi*, tendo sido sugerido que esta espécie deveria ser colocada num género separado denominado *Murraya* (Stuart e Welshimeri, 1974 em Bakker *et al.*, 2010).

Vários estudos taxonómicos em conjunto com estudos bioquímicos, composição de DNA, e sequenciação do gene rDNA 16S, demonstraram que todas as espécies pertencentes a este género formam um grupo homogéneo e relacionado com alguns membros do género *Brochothrix*, justificando assim o estatuto de ambos se encontrarem na mesma família (Vos *et al.*, 2009).

Para a deteção de *Listeria* spp. e distinção entre espécies, existem inúmeros métodos que podem ser efetuados, baseados nas características fenotípicas e genotípicas.

Exemplos de métodos fenotípicos são os bioquímicos, serológicos e tipagem fágica. No entanto, os resultados destes métodos podem variar com condições externas, com a fase de crescimento e com mutações genéticas espontâneas, fazendo com que uso destes métodos conduza a resultados ambíguos (Jeyaletchumi *et al.*, 2010).

Por esse motivo, Frece *et al.* (2010) sugeriram que deveria existir uma maior dependência de métodos genotípicos, pois estes demonstram ser mais confiáveis e sensíveis que os métodos fenotípicos (em Jadhav *et al.*, 2012). Os métodos genotípicos assentam em métodos

moleculares, que detectam *Listeria* spp., através da utilização de sondas de ácidos nucleicos ou através da amplificação dos mesmos (Liu, 2006).

## 1.2. Potencial de patogenicidade

Alguns membros do género *Listeria* são responsáveis por uma doença alimentar com grande impacto para a saúde pública, a listeriose humana. Desde a década de 1980, quando surgiram uma série de surtos epidémicos de listeriose em humanos nos EUA e na Europa, que esta é considerada uma importante infeção de origem alimentar.

Nos humanos a doença severa ocorre nos recém-nascidos, nas crianças, nos idosos e naqueles que possuem o sistema imunitário comprometido. As manifestações variam desde sintomas leves, como gripe e diarreia, a sintomas que colocam a vida em risco, caracterizados por septicemia e meningoencefalites. Nas mulheres grávidas a infeção pode ser transmitida para o feto, causando aborto.

As infeções humanas são raras, mas são importantes uma vez que se encontram associadas a elevadas taxas de mortalidade. De facto, estes organismos estão entre as principais causas de morte através de infeções com origem alimentar em países industrializados.

O número de casos de listeriose humana aumentou 19,1% comparado com 2008, com 1645 casos confirmados em 2009, com a elevada taxa de casos de fatalidade de 16,6%. As taxas de notificações mais elevadas foram observadas na Dinamarca, Espanha e Suíça. As pessoas idosas foram as mais afetadas por esta doença, com 58,5% dos casos (Anónimo, 2011).

Em Portugal, a listeriose ainda não é uma doença de declaração obrigatória, pelo que os dados disponíveis são escassos. No relatório conjunto *European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control* (EFSA/ECDC) foram apresentados dados referentes a Portugal apenas para o ano de 2004, 34 casos humanos. Segundo Ana Leça (2012), de 2000-2010 existiram 198 casos de listeriose em Portugal. Em 2010 foram noticiadas segundo a Direção Geral de Saúde, 13 mortes devido a listeriose, na região de Lisboa e vale do Tejo ([[http://www.dn.pt/inicio/portugal/interior.aspx?content\\_id=1637454&seccao=Sul](http://www.dn.pt/inicio/portugal/interior.aspx?content_id=1637454&seccao=Sul) Acedido em 17/08/2012]).

Estima-se que a via de transmissão para humanos ocorre através do consumo de alimentos. Mead *et al.* (1999) estimam que o consumo de produtos alimentares contaminados é responsável por 99% dos casos de listeriose humana (em Hain *et al.*, 2006). Segundo Anónimo (2011), a infeção também pode ser transmitida diretamente de animais infetados para humanos, assim como entre humanos. A transmissão animais-humanos ocorre, pois os animais são portadores assintomáticos que espalham listeria em números significativos através de fezes, contaminando o meio ambiente, via ciclo fecal-oral.

*L. monocytogenes* é a espécie responsável pelo maior número de casos de listeriose humana. No entanto, muito raramente, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* têm sido associadas a doenças no Homem (Jadhav *et al.*, 2012).

*L. monocytogenes* engloba um espectro de estirpes com patogenicidade e virulência variada. Enquanto muitas estirpes de *L. monocytogenes* são naturalmente virulentas e capazes de

produzir morbidade e mortalidade elevada, outras são não virulentas sendo incapazes de estabelecer infecção (Liu *et al.*, 2007).

É importante compreender a evolução e ecologia de *L. monocytogenes* para uma prevenção eficaz e melhorada da listeriose.

Existem duas grandes abordagens utilizadas na tipificação de *L. monocytogenes*: a fenotípica e genotípica (Jeyaletchumi *et al.*, 2010). Serotipagem, fagotipagem, *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE) são alguns exemplos de métodos de tipificação fenotípica; *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), ribotipagem e técnicas de tipificação baseadas em reações de PCR, nomeadamente serotipagem molecular, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *repetitive extragenic palindrome* (REP), *enterobacterial repetitive extragenic palindrome* (ERIC), *multilocus sequence typing* (MLST) são exemplos de métodos de tipificação genotípica. PFGE e RAPD são as técnicas mais utilizadas para tipificar as estirpes de *L. monocytogenes* (Atil *et al.*, 2011). Os métodos de tipificação fenotípicos são geralmente menos sensíveis, possuem baixa diferenciação e não são facilmente reprodutíveis, enquanto os genotípicos são mais sensíveis e fidedignos (Jadhav *et al.*, 2012).

As espécies de *Listeria* possuem múltiplos marcadores de superfície, somáticos (O) e flagelares (H), úteis na tipificação, que permitem que *L. monocytogenes* seja diferenciada em 13 serótipos diferentes: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (Vos *et al.*, 2009).

Diferentes estudos de tipificação genéticos têm sugerido que existem em *L. monocytogenes* diferentes divisões/linhagens genéticas. Estudos filogenéticos demonstraram que *L. monocytogenes* consiste em três linhagens: a) estirpes *L. monocytogenes* da linhagem I, que incluem os serótipos 1/2b, 4b, 4d, 4e, 3b e 7, e estão associados a listerioses epidémicas; b) estirpes de *L. monocytogenes* da linhagem II, que incluem os serótipos 1/2a, 1/2c e 3a, que são frequentemente contaminantes de alimentos *ready-to-eat* (RTE) e de outros produtos alimentares e que contribuem significativamente para listerioses esporádicas; e as estirpes da linhagem III, que incluem os serótipos 4a, 4c e 7, que são primeiramente associados a listeriose animal, uma vez que apenas 1% das listerioses são atribuídas a esta linhagem (Velge e Roche, 2010). Estudos recentes têm demonstrado que os isolados da linhagem III podem ser classificados em três subgrupos: IIIA, IIIB e IIIC (Roberts *et al.*, 2006 em Velge e Roche, 2010). Roberts *et al.* (2006) verificaram que isolados das linhagens IIIA e IIIB formavam um grupo monofilético, enquanto os isolados IIIB eram agrupados separadamente; Ward *et al.* (2008) sugeriram a separação dos isolados de *L. monocytogenes* em quatro linhagens, onde o subgrupo IIIA e IIIC formam a linhagem III e o subgrupo IIIB forma a linhagem IV (em Orsi *et al.*, 2011).

### 1.2.1. *Listeria* spp. no ambiente

Embora estas bactérias sejam raramente isoladas das águas do mar não poluídas e águas subterrâneas, onde a disponibilidade de nutrientes é limitada, estas são encontradas em rios, esgotos, e efluentes industriais e agrícolas. A incidência de *Listeria* spp. na água, parece aumentar com a atividade humana e animal, uma vez que as águas poluídas contêm vários nutrientes essenciais para o crescimento de listeria em comparação com as águas não poluídas. *Listeria* spp. são também isoladas frequentemente do solo e das plantas, onde existem como saprófitas. Em particular, *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo de animais e humanos, e *L. ivanovii* sobretudo de animais ungulados; as restantes espécies são consideradas saprófitas que se adaptaram a viver em vida livre no solo e na vegetação em decomposição (Vos *et al.*, 2009). Segundo Ecker *et al.* (2005), *L. monocytogenes* é considerada um patógeno de prioridade de categoria B, um agente notificável, um patógeno humano globalmente importante, um patógeno alimentar principal e um agente zoonótico, enquanto *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* são consideradas apenas agentes zoonóticos.

Existem ainda outros ambientes onde *Listeria* spp. pode persistir e multiplicar-se, tais como alimentos e seus ambientes de processamento.

Nos alimentos *Listeria* spp. pode ser isolada de peixes, marisco e em diversas carnes para consumo humano (ex. galinha, porco e vaca). A sua presença em laticínios e em vegetais é geralmente baixa. Os alimentos que se destacam são os RTE, devido a este tipo de alimentos não necessitar de cozedura, à capacidade que estas bactérias possuem de se multiplicar em condições de temperaturas de refrigeração e em condições anaeróbias e também à tendência para um aumento do consumo desse tipo de alimentos nas últimas décadas (Vos *et al.*, 2009). Na União Europeia, os limites legais de segurança para os RTE são  $\leq 100$  ufc/g. Dados de Anónimo (2011) indicaram que os RTE disponíveis nas lojas que excederam esse limite mantiveram-se a níveis baixos. No entanto, durante o processamento a maioria das amostras não cumpriram com o critério de ausência de *L. monocytogenes*. Os níveis mais elevados de não-conformidade foram em queijo, especialmente os queijos de pasta mole ou semi-mole e produtos cárneos, seguido por outros produtos RTE.

Em Portugal, *L. monocytogenes* já foi isolada em peixe importado e em ambientes de processamento de peixe fumado e *Listeria* spp. têm sido isoladas em alimentos crus e RTE, incluindo os alimentos vendidos a retalho (Chambel *et al.*, 2007). Recentemente, a Agência Espanhola de Segurança Alimentar e Nutrição (AESAN) do Ministério da Saúde alertou no dia 17 de Setembro de 2012, para a presença de *L. monocytogenes* em vários queijos frescos provenientes de Portugal ([[http://sol.sapo.pt/inicio/Sociedade/Interior.aspx?content\\_id=59320](http://sol.sapo.pt/inicio/Sociedade/Interior.aspx?content_id=59320) Acedido em 19/09/2012]).

Devido à presença de *L. monocytogenes* e restantes espécies de *Listeria* em alimentos cozinhados, Gravani (1999) indicou que a contaminação de alimentos ocorre após o processamento de alimentos.

Blackman e Frank (1996) demonstraram que *L. monocytogenes* é capaz de formar biofilmes nas superfícies de contacto de diferentes produtos alimentares, o que justifica a presença e a sobrevivência de *Listeria* spp. após higienização. Tem sido descrito que *L. monocytogenes* tem a capacidade de formar biofilmes em superfícies de contacto comumente utilizadas no ambiente de processamento de alimentos, tais como plástico, borracha, aço inoxidável e vidro (Chae e Schraft, 2000) e que estirpes de *L. monocytogenes* são capazes de persistir nos ambientes de processamento dos alimentos por mais de 12 anos e contaminar os produtos intermitentemente (Kovačević *et al.*, 2012).

Assim, numerosos estudos têm-se focado na presença de *Listeria* spp. em ambientes de produção e nos padrões de contaminação.

### **1.2.2. Susceptibilidade a antibióticos**

A terapia de escolha para o tratamento da listeriose consiste na administração de ampicilina ou penicilina G combinados com um aminoglicósido, classicamente a gentamicina. A associação de trimetoprim com uma sulfonamida, como o sulfametoxazole com co-trimoxazole, é considerada como a segunda escolha de terapia, geralmente administrada no caso de doentes alérgicos aos antibióticos da classe  $\beta$ -lactâmicos (Charpentier e Courvalin, 1999; Conter *et al.*, 2009). A existência de resistência e multirresistência a antibióticos comumente utilizados no tratamento de listeriose é uma grande preocupação para a saúde pública.

Com a exceção da resistência natural *in vitro* às antigas quinolonas, fosfomicinas e a um largo espectro de cefalosporinas, *Listeria* spp. são largamente susceptíveis às classes de antibióticos clinicamente relevantes contras as bactérias gram-positivas. A primeira estirpe resistente de *L. monocytogenes* foi descrita em 1988 (Poyart-Salmeron *et al.*, 1990 em Charpentier e Courvalin, 1999). Deste então tem ocorrido um aumento do número de descrições de estirpes resistentes isoladas de alimentos, animais e humanos (Arpin *et al.*, 1992; Charpentier *et al.*, 1995; Facinelli *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1994; Harden *et al.*, 1993; MacGowan *et al.*, 1990; Poyart-Salmeron *et al.*, 1992; Quentin *et al.*, 1990; Slade *et al.*, 1990 em Charpentier e Courvalin, 1999).

Ainda que *L. monocytogenes* seja a espécie mais associada a listeriose humana, a avaliação de outras *Listeria* spp. é importante, uma vez que ocorre a transferência de genes de resistência a antibióticos entre estirpes de *Listeria* spp. Essa transferência também ocorre com *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* spp., ou até mesmo entre bactérias não patogénicas (Charpentier e Courvalin, 1999). As bactérias podem transferir outros genes de resistência a antibióticos no ambiente, alimentos, ou mesmo no trato intestinal humano e animal. Uma prova dessa afirmação surge, por exemplo, no estudo de Morvan *et al.* (2010), em que os mecanismos de resistência aos antibióticos encontrados em estirpes resistentes de isolados clínicos, alimentares e ambientais, eram os mesmos. Pesavento *et al.* (2010) afirmam que *Listeria* spp. possuem o mesmo padrão de outras bactérias no mundo, relativamente ao aumento da frequência de isolados resistentes a antibióticos. Esses eventos são devido à presença de plasmídeos e transposões que são cedidos entre estirpes por conjugação,

transformação e transdução. Também eventos de mutações nos genes cromossomais podem ter um papel na conferência da resistência em *Listeria* spp. (Chen *et al.*, 2010).

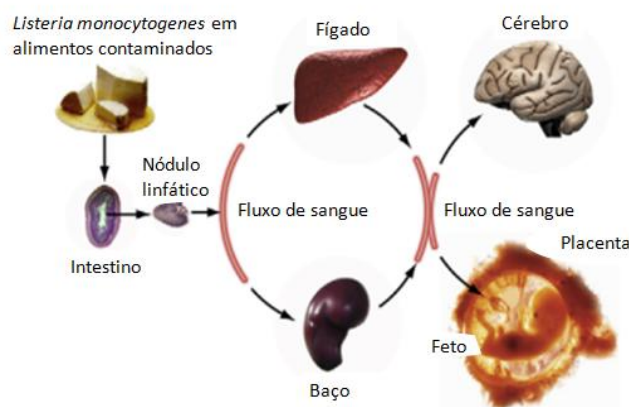
A emergência e o desenvolvimento de *Listeria* spp. resistentes a antibióticos tem sido atribuído ao uso abusivo de antibióticos no tratamento e promoção de crescimento de gado (Harakeh *et al.*, 2009; Hernando *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2010).

Os estudos na última década têm providenciado evidências documentadas que têm surgido *Listeria* spp., incluindo *L. monocytogenes*, resistentes a vários antibióticos tais como ácido nalidíxico, ampicilina, cefalosporina, cefotaxime, cefalotina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, flumequina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, metilicina, oxacilina, penicilina G, rifampina, rifampicina, sulfonamida, sulfametazole-trimetoprim, tetraciclina, teicoplanina, vancomicina (Altuntas *et al.*, 2012; Charpentier e Courvalin., 1999; Conter *et al.*, 2007; Reis *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2006; GelbíčovÁ e KaRpíšKoVÁ, 2012). Embora seja rara, a resistência à tetraciclina é o fenótipo de resistência mais frequentemente descrito em *Listeria* spp. de diferentes origens (Bertrand *et al.*, 2005).

Devido à emergência de estirpes de *Listeria* spp. resistentes e multirresistentes é então importante efetuar a monitorização de resistência antimicrobiana em *Listeria* spp., para: i) perceber as mudanças nos padrões de resistência mais comuns; ii) implementar medidas pró-ativas para o controle do uso dos agentes antimicrobianos; iii) prevenir a disseminação de estirpes multirresistentes que podem levar a consequências indesejáveis.

### 1.2.3. Factores de virulência

Como já mencionado, as estirpes patogênicas de *Listeria* causam uma doença severa, listeriose. Estas bactérias têm a aptidão de conseguir atravessar três barreiras: barreira intestinal, barreira hemato-encefálica e barreira materno-fetal (Figura 1). Tal é possível, pois listeria resiste à morte intracelular quando é fagocitada pelos macrófagos e tem a capacidade de invadir vários tipos de células, que são normalmente não fagocitárias (Cossart *et al.*, 2008), através da produção de vários factores de virulência.



**Figura 1.** Passos sucessivos da disseminação de *L. monocytogenes* por três barreiras: barreira intestinal, barreira hemato-encefálica e barreira materno-fetal, provocando listeriose humana (adaptado Cossart *et al.*, 2008).

Embora já se tenha registado a descrição de plasmídeos em listeria, todos os factores de virulência descritos até à data são codificados cromossomicamente. Os genes de virulência de *L. monocytogenes*, assim como de outras espécies patogénicas deste género, estão organizados, na maior parte, em ilhas de patogenicidade (PAIs). PAIs são normalmente adquiridas pela bactéria via transferência horizontal, por vezes como parte de elementos genéticos móveis, e que conseqüentemente têm um papel chave na evolução da virulência bacteriana (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Já foram identificadas duas ilhas de patogenicidade em *Listeria*, a ilha de patogenicidade 1 (LIPI-1) e a ilha de patogenicidade 2 (LIPI-2) (Hain *et al.*, 2006; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Apresenta-se de seguida a lista dos genes de virulência chave para que se inicie o ciclo de infeção no hospedeiro.

#### Hemolisina

A atenção dos investigadores foi inicialmente direccionada para a atividade hemolítica, classicamente considerada como um marcador de virulência pois está presente em espécies patogénicas e ausente nas não-patogénicas, existindo por isso uma forte correlação entre a atividade hemolítica e a patogenicidade no género *Listeria* (Ivanov *et al.*, 1982 em Bhat *et al.*, 2012).

Estes estudos levaram à descoberta do gene responsável por esta atividade, *hly*, e à caracterização do seu produto génico que contém uma função crítica para a sobrevivência como parasita nas células eucarióticas do hospedeiro. A hemolisina de *L. monocytogenes*, listeriosina O (LLO), é uma toxina formadora de poros, que pertence a uma família dependente de colesterol. Mais tarde, a hemolisina de *L. ivanovii*, ivanolysina O (ILO) foi purificada e caracterizada. Foi também demonstrado que espécies de *L. seeligeri*, consideradas não-patogénicas, são produtoras de uma hemolisina relacionada com LLO, que permite a produção de uma fraca hemólise. A identificação deste gene foi rapidamente seguida pela caracterização completa do *locus* genético onde este gene se situa, LIPI-1 (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

#### Fosfolipases

*Listeria* spp. produz três diferentes fosfolipases que estão envolvidas na virulência: *phosphatidylinositol-phospholipase C* (PI-PLC), codificada pelo gene *plcA*, e *phosphatidylcholine-phospholipase C* (PC-PLC), codificada pelo gene *plcB*, que são produzidas tanto em *L. monocytogenes*, como em *L. ivanovii* e SmcL (esfingomielinase C) codificada pelo gene *smcL*, específica de *L. ivanovii* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

#### Metaloprotease

A metaloprotease, codificada pelo gene *mpl*, possui um papel indireto na virulência, estando envolvida na ativação de PC-PLC para o início de um novo ciclo de infeção (Bakker *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2006, Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

#### Actina

Actina é uma proteína de superfície, codificada pelo gene *actA*, que tem como função a mobilidade e a disseminação célula-a-célula, através da polarização da actina em caudas que propulsionam a bactéria para a membrana citoplasmática (Hain *et al.*, 2006).

### Família das internalinas

Corresponde a uma família de proteínas de superfície onde todas possuem domínios ricos em leucina repetidos (LLR). Em *L. monocytogenes* os primeiros membros desta família a serem caracterizados foram InIA e InIB, codificadas pelo operão *inIAB*., seguidas de InIC, InIC2, InID, InIE, InIF, InIG, InIH e InIJ (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Com exceção dos genes *inIC* e *inF*, todos os membros desta família são sempre encontrados em *clusters* de dois ou mais genes, todos orientados na mesma direção. Sabe-se que InIA e InIB possuem um papel essencial na entrada de listeria nas células hospedeiras, InIC contribui para os estágios pós-intestinais de *L. monocytogenes*, e InIJ encontra-se envolvida diretamente na passagem de *L. monocytogenes* nas barreiras intestinais, bem como se encontra envolvida nos estágios subseqüentes de infecção e virulência (Liu *et al.*, 2007).

Têm sido descritas diversas internalinas homólogas de *L. monocytogenes* em *L. ivanovii*, nomeadamente i-InIC, i-InID, i-InIE, i-InIF e i-InIG (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

### Regulação PfrA

PfrA é um regulador positivo que se encontra directamente envolvido no controlo da expressão dos genes de virulência e é codificado pelo gene *pfrA*, situado em LIPI-1. Pertence à família de uma proteína receptora, cAMP. O gene *pfrA* situa-se a jusante e por vezes é cotranscrito com o gene *plcA*. Alguns dos membros regulados por PfrA incluem os genes de LIPI-1 e vários genes da família de internalinas, tais como *inIC* de *L. monocytogenes* e *i-inIE* de *L. ivanovii*. Existem genes que são parcialmente regulados, tais como o operão *inIAB*.

Para não existir uma expressão desnecessária de PfrA, esta é apenas activada durante a infecção da célula hospedeira. Um número de sinais que marcam a transição entre o ciclo de vida extracelular e intracelular são transmitidos por PfrA via mecanismos diferentes, ainda mal compreendidos (Heras *et al.*, 2011; Liu, 2006; Vázquez-Bolland *et al.*, 2001).

### Proteína extracelular *iap* ou p60

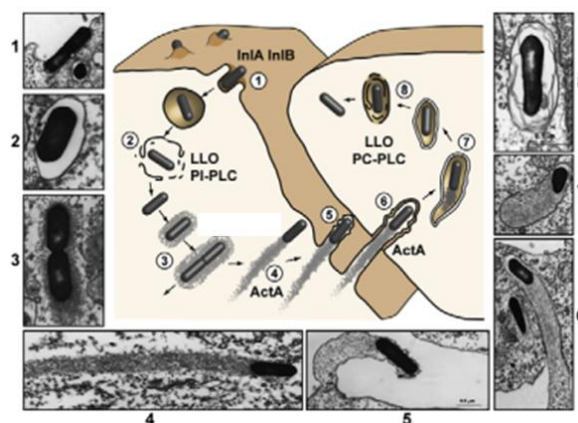
É uma proteína associada à invasão, codificada pelo gene *iap*. É um gene comum a todos os membros do género *Listeria*. O papel principal desta proteína é a separação do septo na última etapa da divisão celular, ou seja, é essencial para a viabilidade da célula e, adicionalmente, tem um papel na aderência às células do hospedeiro (Bubert *et al.*, 1999).

Todos os factores de virulência contribuem para o ciclo de infecção. O ciclo de infecção em *L. monocytogenes* em culturas de células tem sido estudado em detalhe:

### Ciclo de infecção em *L. monocytogenes* (Figura 2)

O ciclo inicia-se com a adesão à superfície das células eucarióticas e a subsequente penetração. Este mecanismo designa-se por mecanismo de *zipper*, que envolve a interação de ligandos da superfície das bactérias (InIA e InIB) com os seus respectivos receptores (E-caderina e factor de complemento C1q, respectivamente). O resultado deste mecanismo é a internalização da bactéria e a sua incorporação dentro de um vacúolo de membrana simples (fagossoma). LLO e PI-PLC vão atuar em sinergia para permitir a lise do vacúolo e a libertação da bactéria no citosol. Nesse local, *L. monocytogenes* inicia a sua replicação e a polimerização

de ActA. O processo de polimerização ocorre num dos pólos da bactéria, que produz energia para impulsionar a bactéria que se vai movendo no citosol. Quando esta se encontra na membrana plasmática, a bactéria fica envolvida numa estrutura designada de filopodia, onde é reconhecida e envolvida pelas células adjacentes, gerando um vacúolo com dupla membrana. A lise deste vacúolo e os sinais resultantes iniciam um novo ciclo de infeção, que se encontra dependente de PC-PLC, que é activado por Mpl (Cossart *et al.*, 2008; Hain *et al.*, 2006; Liu, 2006).

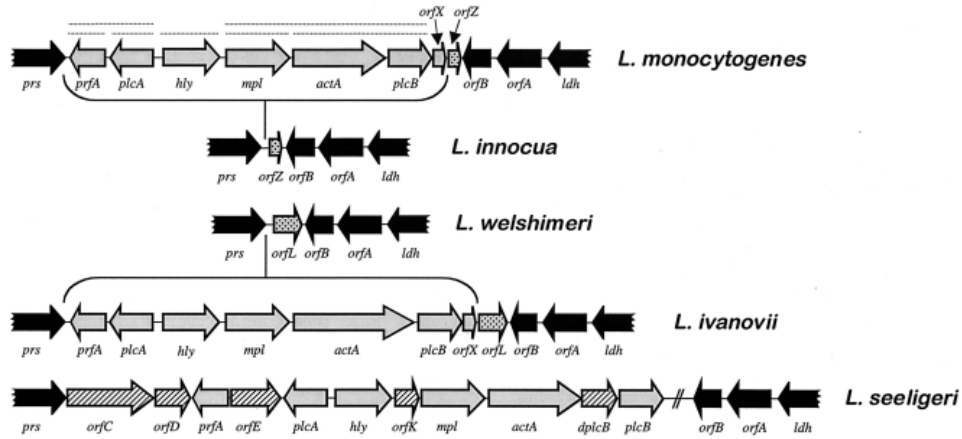


**Figura 2.** Representação do ciclo de infeção de *L. monocytogenes* (retirado de Cossart *et al.*, 2008).

Tal como foi referido, os factores de virulência são principalmente requeridos para colonizar o tecido animal e para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro durante a infeção. Portanto, a sua síntese fora do hospedeiro pode representar um “fardo” que compromete a capacidade de listeria sobreviver no ambiente natural e limitar o potencial de transmissão. Existem evidências que *L. monocytogenes* possui mecanismos de sinais sensoriais e de transdução para explorar os diversos ambientes físico-químicos que pode encontrar de forma a adaptar a expressão dos genes de virulência para necessidades particulares de ciclo de vida saprófita *versus* parasítica. Dois exemplos são a temperatura, que controla a transcrição de *pfrA* (a 30°C é baixa, mas começa a ser induzida a 37°C, a temperatura média corporal do hospedeiro) e, os glícidos fermentáveis, que causam uma forte repressão dos genes de virulência em *L. monocytogenes*, normalmente presentes no ciclo de vida saprófita (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Para a investigação do potencial de patogenicidade de bactérias do género *Listeria* procede-se à pesquisa de alguns destes genes através de reações de PCR multiplex, ou por ensaios fenotípicos de produção de hemolisina e fosfolipases (PC-PLC e PI-PLC), muitas vezes em combinação com ensaios de virulência em ratos e em embriões de aves. Em estudos já efetuados, na pesquisa de genes de virulência em estirpes de *L. monocytogenes* de variadas origens (clínicas, alimentares e ambientais), existe sempre um perfil de flutuação relativamente à presença dos genes de virulência chave para a infeção. Tal poderá acontecer devido a mutações de uma região particular. Normalmente essas estirpes são designadas de avirulentas (Gelbíčová e KaRpíšková, 2012; Indrawattana *et al.*, 2011; Jallewar *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2010; Maklon *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2008; Rawool *et al.*, 2007a).

Na Figura 3 encontra-se representada a LIPI-1. A estrutura genética de LIPI-1 de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* é idêntica, tendo um grau de semelhança de 73-78%, divergindo apenas na estrutura de *actA*. LIPI-I encontra-se ausente nas espécies não-patogênicas de *Listeria*, apenas com uma exceção, *L. seeligeri*, onde LIPI-I se encontra numa forma de estrutura intacta mas os genes não são expressos corretamente (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).



**Figura 3.** Organização física do *cluster* central de virulência e a estrutura do seu *locus* em algumas espécies de *Listeria* (retirado de Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

A presença ou ausência de LIPI-1, bem como as características de virulência podem ser usadas para classificar as espécies de *Listeria* e agrupá-las em três grupos: (i) espécies que contenham LIPI-I, e que são patogênicas (*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*); (ii) espécies que não possuem LIPI-I e que não são patogênicas (*L. marthii* e *L. welshimeri*) e (iii) espécies cuja presença/ausência varia com as estirpes. O último grupo contém *L. seeligeri* em que a maioria das estirpes contém LIPI-I, e *L. innocua* em que a maioria das estirpes não possui LIPI-I (Bakker *et al.*, 2010).

### 1.3. Objetivos do estudo

A listeriose humana é uma doença com elevado impacto para a saúde pública, uma vez que provoca uma elevada morbidade e mortalidade. É provocada por bactérias patogénicas pertencentes ao género *Listeria*. Essa patogenicidade é associada à presença de vários factores de virulência bem como resistência a antibióticos, principalmente a antibióticos para o tratamento de listeriose.

As bactérias pertencentes a este género são ubíquas e conseguem sobreviver e multiplicar-se em condições extremas, potencializando a sua presença em alimentos e nos seus locais de processamento, o que é alarmante, uma vez que está demonstrado que a transmissão das espécies patogénicas deste género para os humanos ocorre por ingestão de alimentos contaminados.

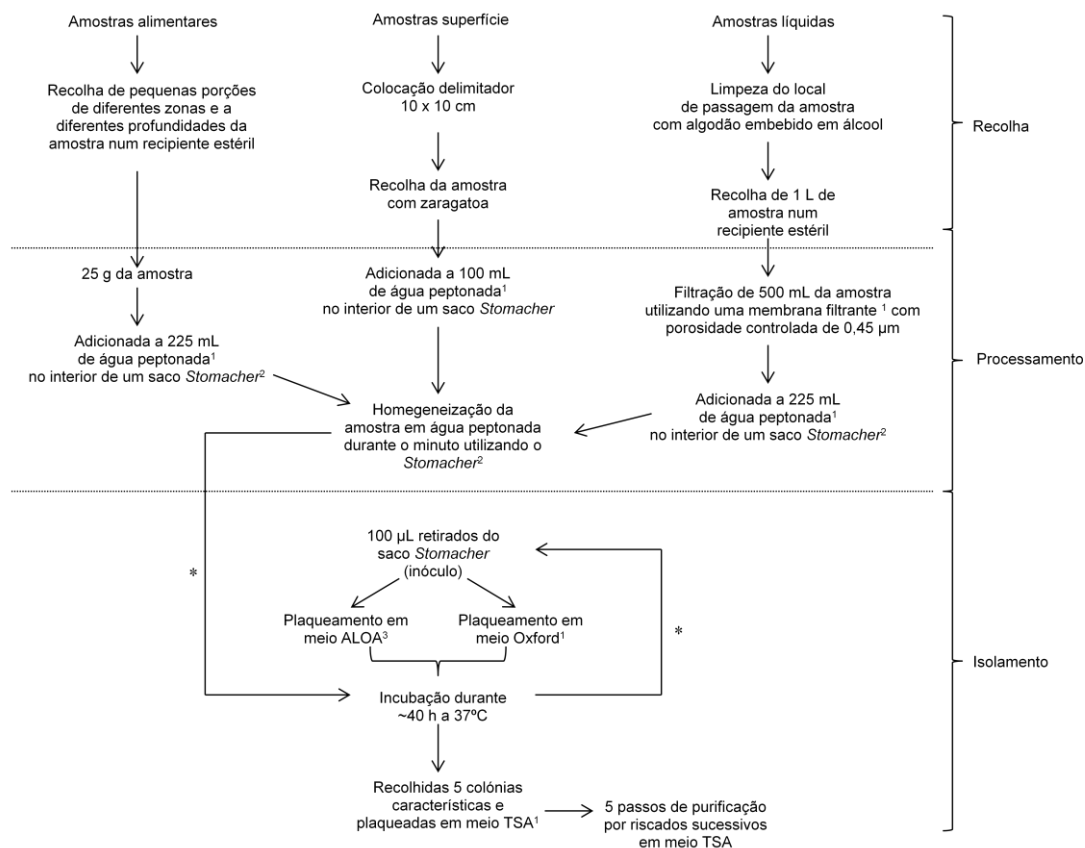
Tendo em conta este panorama, o presente estudo teve como objetivos principais: 1) o isolamento de *Listeria* spp. de alimentos e superfícies em três locais distintos: fábrica de queijos, matadouro de suínos e hipermercado; 2) a caracterização molecular dos isolados; 3) a pesquisa da susceptibilidade a antibióticos; 4) a pesquisa da presença e expressão de factores de virulência. Os resultados desses quatro objetivos permitem-nos responder ao nosso objetivo final: 5) avaliação do potencial patogénico dos membros da coleção em estudo. De forma a responder a este último objetivo, integramos na nossa coleção isolados clínicos, uma vez que estes são comprovadamente patogénicos e poderão auxiliar na compreensão do potencial de patogenicidade presente nos isolados da nossa coleção.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Recolha, processamento e isolamento

Para a criação da coleção de *Listeria* spp., foi efetuada a recolha de amostras em três locais distintos: fábrica de queijos, matadouro de suínos e hipermercado.

Em cada local, foram recolhidas três tipos de amostras: alimentares, de superfície e líquidas. Na Figura 4 encontram-se esquematizados todos os passos realizados na recolha e processamento das amostras, e no isolamento de *Listeria* spp.



**Figura 4.** Esquema representativo dos passos efetuados na recolha, processamento e isolamento.

\*Passos de enriquecimento, onde após a incubação se repete os mesmos passos do isolamento.

<sup>1</sup>Scharlau, Barcelona, Espanha; <sup>2</sup>Stomacher Lab-Blender 400; <sup>3</sup>Merck, Darmstadt, Alemanha; ALOA, Agar *Listeria* selective base acc. Ottaviani and Agosti, TSA, Tryptic Soy Agar.

De forma a complementar a coleção *Listeria* spp., foram gentilmente fornecidas estirpes de origem alimentar, nomeadamente: sete estirpes *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a-3a e uma estirpe *L. monocytogenes* serogrupo 4b-4e-4ab, isoladas de peixe, fornecidas pelo Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo (IMV), Espanha; três estirpes *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a-3a e seis estirpes *L. monocytogenes* serogrupo 4b-4e-4ab, isoladas de queijo, fornecidas pela Doutora Manuela Sol, do Instituto Nacional de Recursos Biológicos (INRB), Portugal.

Para avaliar o potencial patogénico da coleção foram gentilmente fornecidas estirpes clínicas de pacientes diagnosticados com listeriose, nomeadamente: uma estirpe *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a-3a, uma estirpe *L. monocytogenes* serogrupo 1/2c-3c e sete estirpes *L. monocytogenes* serogrupo 4b-4e-4ab fornecidas pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Laboratório de Zoonoses bacterianas, Brasil; uma estirpe *L. monocytogenes* serogrupo 1/2a-3a e duas estirpes *L. monocytogenes* 4b-4e-4ab fornecidas do Statens Serum Institut (SSI), Dinamarca; uma estirpe *L. monocytogenes* 4b-4e-4ab fornecidas pelo Hospital de Cascais Dr. José Almeida, Portugal.

## 2.2. Identificação ao nível de género/espécie e tipificação por métodos moleculares

### 2.2.1. Identificação por métodos fenotípicos

A identificação por métodos fenotípicos ao nível de género foi realizada através dos seguintes passos: 1) observação das colónias características no meio ALOA e Oxford; 2) avaliação da hidrólise da esculina pelo crescimento dos isolados no meio *Bile Esculin Azide Agar* (BEAA) (Scharlau, Barcelona, Espanha); 3) reação da catalase; 4) reação da oxidase; e 5) coloração de Gram.

Os isolados identificados fenotipicamente como pertencentes ao género *Listeria* foram armazenados em *Brain Heart Infusion* (BHI) (Scharlau, Barcelona, Espanha) com 20% (v/v) glicerol a -80 °C. Para uso de rotina, os isolados foram cultivados em meio BHI sólido, através de uma picada central, e mantidos a 4 °C.

### 2.2.2. Identificação por métodos moleculares

A identificação por métodos moleculares foi executada através de uma reação de PCR-multiplex descrita por Kérouanton *et al.* (2010). Este método além de proceder à identificação de género, efetua a identificação da espécie *L. monocytogenes* e respectivos serótipos. As condições de reação e a informação dos *primers* apresentam-se na Tabela 1. Informação mais detalhada do PCR-multiplex pode ser encontrada no Anexo, Tabela A1.

**Tabela 1.** Reação de PCR-multiplex para identificação por métodos moleculares.

<i>locus</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de reação PCR	
		Mistura de reação	Condições PCR
<i>lmo1118</i>	906	1 X tampão de reação (NZYTech, Lisboa, Portugal); 0,2 mM de cada dNTP (Promega, EUA); 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> (NZYTech, Lisboa, Portugal); 25 pmol/μL de cada primer (STAB VIDA, Portugal); 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e 1,5 μL de DNA.	94 °C (3 min); 35 ciclos de: 94 °C (45 s), 53 °C (45 s), 72 °C (45 s); 72 °C (5 min), 10 °C (infinito)
<i>lmo0737</i>	691		
<i>ORF2110</i>	597		
<i>ORF2819</i>	471		
<i>prs</i>	370		
<i>pfrA</i>	274		

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Para 10 µL dos produtos da reação de PCR foram adicionados 2 µL da mistura 1:1 azul bromofenol e gel RED e resolvidos através da eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE 0,5 X a 95 V com duração de 1 h 30 min. Para cada gel, um marcador de massa molecular (1 kb Plus, Invitrogen) foi incluído em duas posições. Todos os géis foram fotografados no ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, UK).

### 2.2.3. Tipificação por métodos moleculares

A tipificação por métodos moleculares envolveu a técnica PCR-fingerprinting, com a utilização do *primer* csM13 e técnica ERIC-PCR. As condições de reação e a informação dos *primers* seguem-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Informação dos primers e das condições das reações PCR-fingerprinting e ERIC-PCR.

<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Condições de reação PCR	
		Mix	Condições PCR
csM13	GAGGGTGGCGTTCT	1 X tampão de reação (NZYTech, Lisboa, Portugal); 0,1 mM de cada dNTP (Promega, EUA); 3,5 mM MgCl <sub>2</sub> (NZYTech, Lisboa, Portugal); 12,5 pmol/µL de cada primer (STAB VIDA, Portugal); 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e 1,5 µL de DNA.	94 °C (3 min); 40 ciclos de: 94 °C (45 s), 40 °C (1 min), 72 °C (2 min); 72 °C (5 min), 10 °C (infinito)
ERIC1 ERIC2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC AAGTAAGTGA CTGGGGTGAGCG		

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Para 12 µL dos produtos de reação de PCR foram adicionados 2 µL da mistura 1:1 azul bromofenol e gel RED e resolvidos através da eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) em TBE 0,5 X a 95 V com duração de 2 h 45 min. Para cada gel, um marcador de peso molecular (1 kb Plus, Invitrogen) foi incluído em duas posições. Todos os géis foram fotografados no ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, UK).

## 2.3. Potencial de patogenicidade

### 2.3.1. Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade a 11 agentes antimicrobianos (Tabela 3) foi avaliada pelo método de difusão, usando os *breakpoints* de resistência para *Staphylococcus* spp. estabelecido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007 (CLSI)*. Os *breakpoints* encontram-se reunidos no Anexo, Tabela A2.

**Tabela 3.** Antibióticos utilizados neste estudo.

Classe	Antibiótico	Símbolo	Conteúdo do disco (µg)
Aminoglicósidos	Gentamicina <sup>1</sup>	GM	10
β-lactâmicos Penicilina	Ampicilina <sup>2</sup>	AMP	10
	Penicilina G <sup>2</sup>	P	10
Fenicóis	Cloranfenicol <sup>2</sup>	C	30
Glicopéptidos	Vancomicina <sup>1</sup>	VA	30
Lincosamidas	Clindamicina <sup>2</sup>	CC	2
Macrólidos	Eritromicina <sup>1</sup>	E	15
Quinolonas	Ciprofloxacina <sup>2</sup>	CIP	5
Rifamicina	Rifampicina <sup>2</sup>	RD	5
Sulfonamida	Trimetoprim-Sulfametazole <sup>2</sup>	SXT	25
Tetraciclina	Tetracilina <sup>1</sup>	TE	30

<sup>1</sup>agentes antimicrobianos da marca BioMeuriex; <sup>2</sup>agentes antimicrobianos da marca Oxoid.

### 2.3.2. Pesquisa de factores de virulência

A pesquisa de factores de virulência foi efetuada por ensaios em placa e/ou amplificação de PCR.

Os ensaios em placa tiveram como objetivo a deteção da atividade da gelatinase, da DNase, da hemolisina, da lipase e de PC-PLC.

1) atividade da gelatinase: os isolados foram inoculados no meio *Gelatin peptone agar* (Liofilchem, Itália) e incubados durante 24 h a 37 °C. Após esse período, adicionou-se uma solução de sulfato de amónio saturado. As colónias produtoras da gelatinase foram reconhecidas pela formação de halos transparentes; 2) atividade da DNase: os isolados foram inoculados no meio *DNase test agar* (Liofilchem, Itália) e incubados durante 24 h a 37 °C. Após a incubação adicionou-se reagente azul de toluidina a 0,1%. As colónias produtoras de DNase foram confirmadas pela formação de halos róseos; 3) atividade da hemolisina: os isolados foram inoculados em placas de agar com 5% de sangue de cavalo (Biogerm laboratórios, Maia, Portugal) e incubados aproximadamente 48 h a 37 °C. Zonas claras à volta das colónias indicaram produtores de hemolisina; 4) atividade da lipase: os isolados foram inoculados no meio *Spirit Blue Agar* (Difco, Franklin Lakes, USA), que possui uma coloração azul escura, e incubadas a 37 °C durante 24 h. Após esse período as colónias com organismos lipolíticos foram reconhecidas por uma coloração mais clara à volta das colónias (uma espécie de efeito de halo transparente); 5) atividade de PC-PLC: os isolados foram inoculados no meio de gema de ovo, segundo Alonzo *et al.* (2009), e incubados aproximadamente 48 h a 37 °C. Os isolados produtores desta fosfolipase foram reconhecidos pela formação de um halo opaco.

A pesquisa de alguns genes de virulência chave (*plcA*, *actA*, *flaA*, *hlyA*, *iap*, *inIA*, *inIB*, *inIC* e *inIJ*) para o ciclo de infeção de *L. monocytogenes* foi realizada através de duas reações de

PCR-multiplex. Os *primers* utilizados, assim como as condições de reação, encontram-se descritos na Tabela 4. Informação mais detalhada da reação de PCR-multiplex pode ser encontrada no Anexo, Tabela A1.

**Tabela 4.** Reações de PCR-multiplex utilizados na pesquisa de genes de virulência.

	<i>locus</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Condições de reação PCR	
			Mistura de reação	Condições PCR
PCR-multiplex descrito por Rawool <i>et al.</i> , 2007	<i>plcA</i>	1483	1 X tampão de reação (NZYTech, Lisboa, Portugal); 0,1 mM de cada dNTP (Promega, EUA); 3,5 mM MgCl <sub>2</sub> (NZYTech, Lisboa, Portugal); 12,5 pmol/μL de cada primer (STAB VIDA, Portugal); 1 U de Taq polimerase (Invitrogen) e 1,5 μL de DNA.	94°C (3 min); 40 ciclos de: 94°C (45 s), 40°C (1 min), 72°C (2 min); 72°C (5 min), 10°C (infinito)
	<i>actA</i>	944 ou 839		
	<i>hlyA</i>	538		
	<i>iap</i>	130		
PCR-multiplex descrito por Liu <i>et al.</i> , 2007	<i>inlB</i>	884		
	<i>inlA</i>	800		
	<i>inlC</i>	517		
	<i>inlJ</i>	238		

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Doppio, VWR, Radnor, Pennsylvania, USA). Para 8 μL dos produtos de reação de PCR foram adicionados 3 μL da mistura 1:2 azul bromofenol e gel RED) e resolvidos através da eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) em TBE 0,5 X a 95 V com duração de 1 h 30 min). Para cada gel, um marcador de massa molecular (1 kb Plus, Invitrogen) foi incluído em duas posições. Todos os géis foram fotografados no ImageMaster (PharmaciaBiotech, GE Healthcare, UK).

#### 2.4. Análise de dados

Os perfis obtidos pelas reações de PCR-multiplex, PCR-fingerprinting e ERIC-PCR foram analisados utilizando o programa BioNumerics® versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Na construção do dendrograma para os dados da reação de PCR-multiplex utilizou-se o cálculo de Dice e para os dados das reações de PCR-fingerprinting e ERIC-PCR utilizou-se o coeficiente de Pearson e o método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average*).

Para os dados obtidos após a avaliação da susceptibilidade a antibióticos e pesquisa dos factores de virulência, uma matriz de dados booleanos (presença/ausência de resistência a antibióticos e factores de virulência), foi analisada no programa BioNumerics® versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) utilizando métodos numéricos hierárquicos. As semelhanças foram calculadas com recurso ao coeficiente 'simple matching' e o método de aglomeração UPGMA.

A reprodutibilidade de todas as técnicas foi calculada através da análise aleatória de 10% de réplicas.

A análise do qui-quadrado das tabelas de contingências foi utilizada para determinar a independência estatística entre os isolados identificados como *Listeria-não monocytogenes* e *L. monocytogenes* para a presença de resistências e factores de virulência (Zar, 1996).

## Resultados e Discussão

### 2.5. Disseminação de *Listeria* spp. nos locais de amostragem em estudo

No presente trabalho foi realizada a recolha de vários tipos de amostras (alimentares, superfícies e líquidas), nomeadamente 29 amostras na fábrica de queijos, 20 no matadouro de suínos e 38 no hipermercado. Essas amostras foram processadas e submetidas ao isolamento de *Listeria* spp. através de dois meios seletivos, ALOA e Oxford. Foram escolhidos estes dois meios, pois o uso de, pelo menos dois meios é recomendando, e o uso de ambos aumenta a deteção e a enumeração de estirpes atípicas (Leclerq, 2004; Becker *et al.*, 2006).

As colónias presuntivas de *Listeria* spp. no meio Oxford apresentam coloração castanho-escura resultado da atividade da enzima  $\beta$ -D-glucosidase (esculinase) que cliva a esculina presente no meio que ao reagir com o ferro origina halos castanho-preto à volta das colónias. No meio ALOA as colónias presuntivas de *Listeria-não monocytogenes* (LNM) apresentam coloração verde com um halo transparente. A coloração azul verde é devido à atividade da enzima  $\beta$ -D-glucosidase que cliva o substrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-  $\beta$ -D-glucopiranosida presente no meio, e a formação do halo resulta da atividade de PI-PLC (produzida apenas por estirpes patogénicas) que cliva o substrato L- $\alpha$ -fosfatidilinositol presente, produzindo ácidos gordos insolúveis à volta das colónias. As colónias recolhidas de ambos os meios durante a fase de isolamento apresentavam todas as características mencionadas.

O número de isolados obtidos em cada local de amostragem foi de 28 isolados na fábrica de queijos, 39 isolados no matadouro de suínos e 100 isolados no hipermercado.

Esses isolados foram purificados através de cinco passos de purificação, e submetidos à identificação por métodos fenotípicos (teste da hidrólise da esculina, catalase, oxidase e coloração de Gram). Após esta bateria de testes o número de isolados identificados como *Listeria* spp. diminuiu para 9 isolados na fábrica de queijos, 21 no matadouro de suínos e 47 no hipermercado.

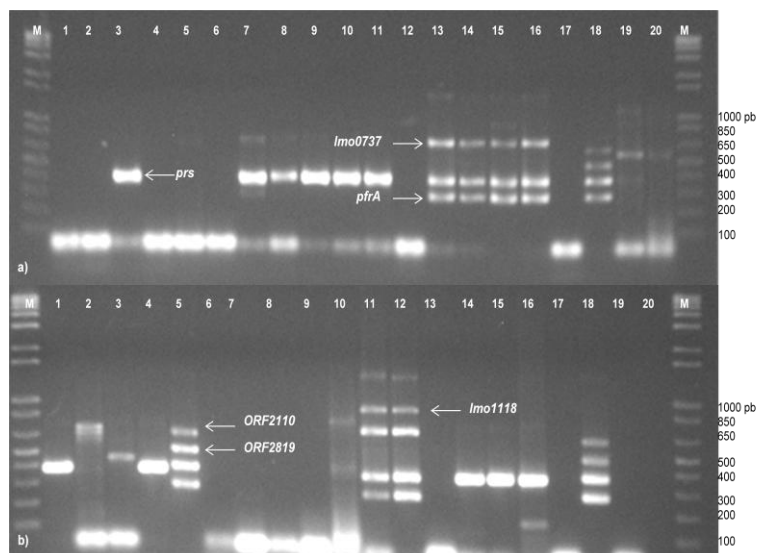
De seguida procedemos à identificação por métodos moleculares através da reação de PCR-multiplex. Esta permite-nos identificar os isolados como LNM e LM. Os detalhes são apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Presença de genes em análise para cada um dos serogrupos.

Identificação	Serogrupo	<i>lmo1118</i>	<i>lmo0737</i>	<i>ORF2110</i>	<i>ORF2819</i>	<i>pfrA</i>	<i>prs</i>
LM	1/2a-3a		+			+	+
LM	1/2b-3b				+	+	+
LM	1/2c-3c	+	+			+	+
LM	4c					+	+
LM	4b-4e-4ab			+	+	+	+

Nota: Estirpes LMN apenas amplificam o *locus prs*.

Utilizando este método, os produtos amplificados para os isolados em estudo encontram-se representados na Figura 5.



**Figura 5.** Exemplo de reações de PCR-multiplex dos isolados em estudo. Eletroforese a): Poço 1,2,4, 5, 6, 12 17, 20 e 21, isolados considerados não listeria; Poço 3, 7, 8, 9, 10 e 11, isolados identificados como LNM; Poço 13, 14, 15 e 16, isolados identificados como LM 1/2a-3a; Poço 17, controlo negativo; Poço 19, controlo positivo CECT935 LM 4b. Eletroforese b): Poço 1, 4, 14, 15, e 16, isolados identificados como LNM; Poço 2,3, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 17, isolados considerados não listeria; Poço 5, isolado identificado como LM 4b-4e-4ab; Poço 11 e 12, isolados identificados como LM 1/2c-3c; Poço 19, controlo positivo CECT935 LM 4b e Poço 20, vazio. LNM – *Listeria-não monocytogenes*; LM – *L. monocytogenes*; M – marcador de massa molecular.

Na Tabela 6, encontra-se o número de isolados obtidos em cada local de amostragem e a sua identificação. Mais informação sobre a origem dos isolados e o número obtido em cada passo de identificação pode ser consultada no Anexo, Tabelas A3, A4 e A5.

**Tabela 6.** Número de isolados e sua identificação nos três locais de amostragem.

Identificação	Serogrupo	Fábrica de queijos	Matadouro de suínos	Hipermercado
LNM	-	5	9	18
LM	1/2a-3a	2	4	9
LM	1/2b-3b			
LM	1/2c-3c			2
LM	4c			
LM	4b-4e-4ab		2	1
NL	-	2	6	14

LNM – *Listeria-não monocytogenes*; LM – *L. monocytogenes*; NL – Não listeria.

Relacionando o número de amostras onde pesquisámos por *Listeria* spp. com o número de amostras onde estas foram isoladas (Anexo, Tabelas A3, A4 e A5), verifica-se que a sua presença na fábrica de queijos foi de 14%, no matadouro de suínos 20%, e no hipermercado de 29%. A presença do género *Listeria* neste estudo é consistente com a presença média observada em vários estudos de isolados de outros países e de produtos similares (Jallewar *et al.*, 2007; Kovačević *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2012). Observando particularmente as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas (n=20), 75,0% pertencem ao

serogrupo 1/2a-3a, 15,0% pertencem ao serogrupo 4b-4e-4ab e 10,0% ao serogrupo 1/2c-3c. Observa-se o isolamento de dois serogrupos que possuem serótipos pertencentes à linhagem II (1/2a, 3a e 1/2c), e um que possui serótipos pertencentes à linhagem I (4b e 4e), especificamente as linhagens que são responsáveis por mais casos de listeriose humana. Observa-se ainda que o serogrupo presente em maior percentagem nos três locais foi o 1/2a-3a. Estudos já efetuados em isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar e ambiental, verificaram que o serótipo encontrado com maior frequência é o serótipo 1/2a. Uma explicação para tal poderá ser o facto de este serótipo possuir mais “habilitações” para sobreviver na matriz de certos alimentos (O’Connor *et al.*, 2009). A maior percentagem de isolamento de estirpes de *L. monocytogenes* do serótipo 1/2a é concordante com os resultados obtidos em vários estudos (GelbíčovÁ e KaRpíšKoVÁ, 2012; Gilot *et al.*, 1996; Lukinmaa *et al.*, 2004).

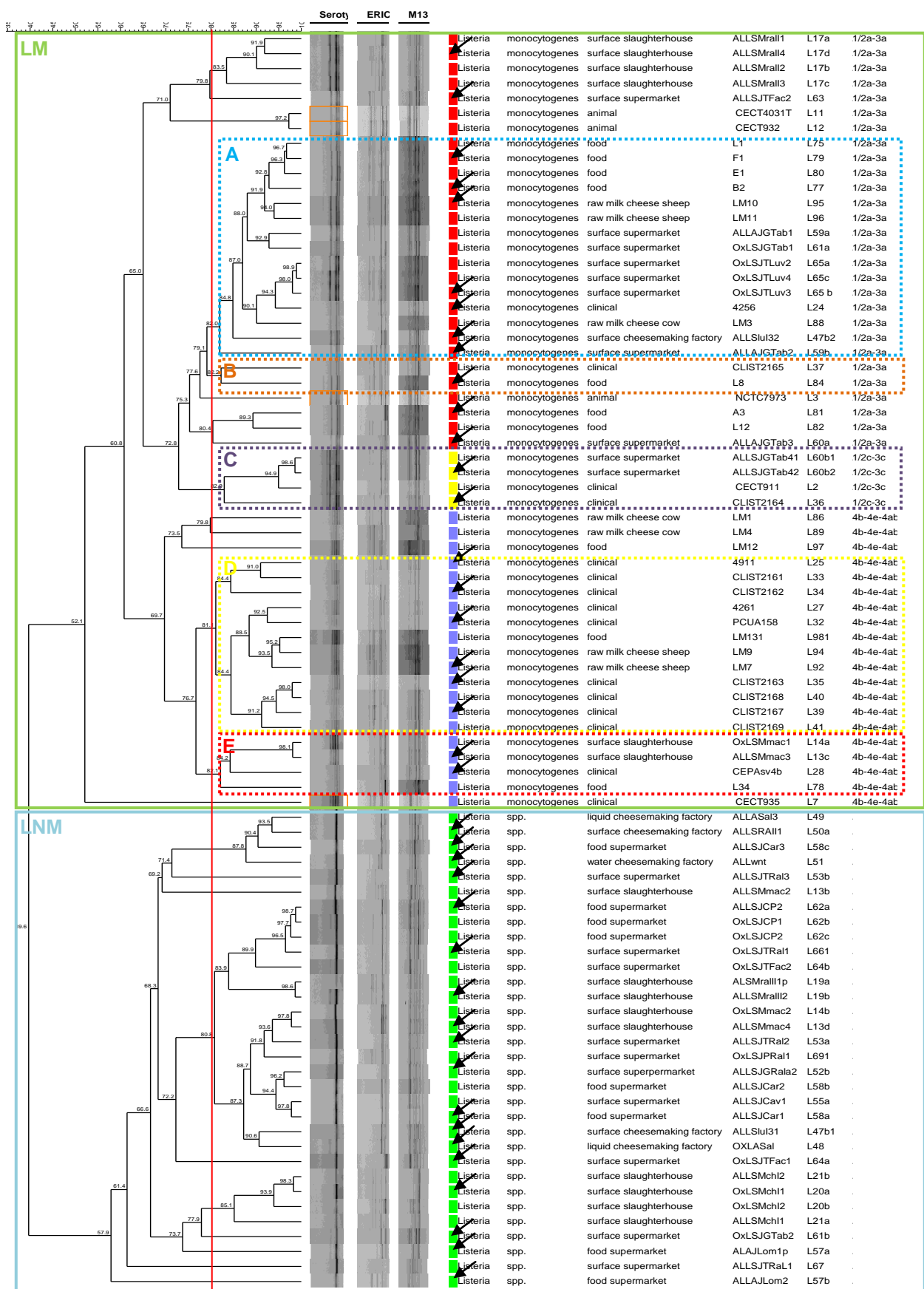
A presença de estirpes de *Listeria* possui um elevado risco para a saúde pública mas é alarmante apenas se as estirpes forem patogénicas, nomeadamente *L. monocytogenes* em alimentos, ou nos seus ambientes de processamento, que quando chegam ao consumidor não são cozinhados. Há que também ter em conta que *L. monocytogenes* engloba um espectro de estirpes com patogenicidade e virulência variada, muitas vezes associada ao seu serótipo. Seguindo esta linha de raciocínio, o que podemos afirmar é que, independentemente da espécie, no matadouro de suínos o risco associado a uma possível listeriose é baixo, uma vez que à partida os produtos cárneos terão que ser cozinhados pelo consumidor; relativamente ao hipermercado já se torna mais elevado, uma vez que tanto existem produtos alimentares que terão que ser cozinhados pelo consumidor como produtos RTE, e é o local que possui os três serogrupos isolados, nomeadamente o serogrupo que inclui um serótipo pertencente à linhagem I (responsável por listeriose epidémica); já na fábrica de queijos o risco associado a uma listeriose é elevado, pois todos os produtos alimentares processados são RTE, mas apenas foi isolado um serogrupo (1/2a-3a). Assim a presença de estirpes de *Listeria* patogénicas na fábrica de queijos é alarmante, já no hipermercado vai depender da origem do isolado, por exemplo, isolados LM disseminados no talho ou peixaria não apresentam um risco elevado, os isolados disseminados na gastronomia e charcutaria já apresentam.

Quanto à análise das técnicas de identificação utilizadas observámos que ocorreu uma redução do número de isolados identificados como *Listeria* spp., revelando que os métodos fenotípicos não são suficientes para uma identificação segura.

Uma vez que várias colónias do mesmo produto e da mesma placa foram recolhidas e isoladas, foi essencial garantir que não estamos na presença de clones. Para tal, recorreu-se a uma técnica de tipificação por métodos moleculares. A partir desta técnica avaliámos a diversidade genética dos isolados obtidos dos três locais de amostragem, através da construção de um dendrograma que inclui: os padrões de bandas obtidas da reação PCR-fingerprinting, e os padrões de bandas obtidas da reação de PCR-multiplex utilizada para determinar os serotipos dos isolados, para uma exclusão de clones mais fidedigna. Efetuamos também a construção de um dendrograma referente aos isolados alimentares (recebidos pelo IMV e INRB) e outro dendrograma referente aos isolados clínicos (recebidos pelo IOC, SSI e

Hospital de Cascais), para com base na percentagem de semelhança existente entre os mesmos, escolher os isolados representativos, de forma a reduzir tempo e custos na pesquisa de factores de virulência e na avaliação da susceptibilidade a antibióticos (resultados não mostrados).

Tendo em conta o objetivo de avaliar o potencial patogénico de todos os isolados foi construído um dendrograma contendo todos os isolados da coleção (Figura 6). Das 87 estirpes avaliadas, apenas 84 foram incluídas no dendrograma, uma vez que para três estirpes não obtivemos amplificação com os primers ERIC. Num estudo anterior, Ruiz-Bolivar *et al.* (2011) também tiveram problemas de amplificação com o primer ERIC, só obtendo amplificação para 84,4% dos isolados. O nível de reprodutibilidade obtido considerando os 10% de réplicas foi de aproximadamente 80% e com base nesse valor selecionou-se o nível de corte de 80%.



**Figura 6.** Dendrograma contendo todos os isolados da coleção *Listeria* spp., construído a partir dos dados de amplificação da reação de PCR-multiplex utilizando o coeficiente de Dice, e dos dados de amplificação das reações de PCR-fingerprinting com o *primer* csM13 e ERIC-PCR, utilizando o coeficiente de Pearson, através do método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA). LM – *L. monocytogenes*; LNM – *Listeria*-não *monocytogenes*; “food” – isolados de peixe; setas pretas – isolados representativos escolhidos; caixa verde – *cluster* de *L. monocytogenes*; caixa azul- *cluster* de *Listeria*-não *monocytogenes*; caixas a tracejado de cor azul, laranja, roxo, amarelo e vermelho, correspondem a *clusters* que contêm isolados alimentares e de superfície com elevada percentagem de semelhança com isolados clínicos.

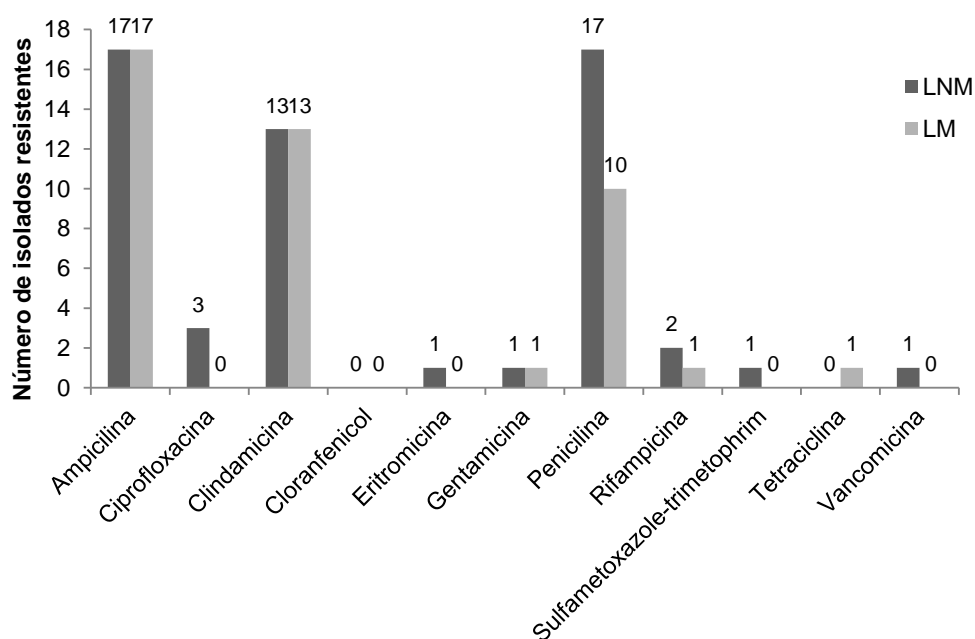
A análise do dendrograma permitiu observar a formação de dois grandes *clusters* principais: o *cluster* que agrupa todas as LM e o *cluster* que agrupa todas as LNM (representados na Figura 6 numa caixa verde e azul, respectivamente). No *cluster* LM, para valores superiores ao nível de corte efetuado (80%), observa-se a formação de vários *subclusters*. Salientamos cinco *subclusters* formados, assinalados na Figura 6 como *subcluster* A, B, C, D, e E que incluem isolados clínicos, uma vez que todos os isolados agrupados nesses *subclusters* poderão representar um elevado risco para a saúde pública. Analisando o *subcluster* A, verificamos que o isolado clínico, 4256, agrupa a 94,3% com isolados de superfície do hipermercado correspondentes a isolados de uma luva de um trabalhador do talho (Ox LSJTLuv2, 3, 4). No entanto, esses isolados não representam um risco tão elevado uma vez que nesse local os alimentos processados são alimentos que irão ser cozinhados, destruindo a bactéria. Os isolados alimentares com origem em peixe (F1, E1 e B2), também se encontram nessa mesma situação. O mesmo não se pode afirmar relativamente aos isolados que se encontram neste *subcluster* e que foram obtidos de queijo (LM10, LM11, LM3), um isolado da superfície de uma luva de um trabalhador da fábrica de queijos (AL LSlu I 3.2) e os isolados de superfície de um tabuleiro da gastronomia (AL LSJGTab 1, 2 e Ox LSJGTab 1), uma vez que se encontram em produtos alimentares RTE ou em superfícies de contacto com produtos alimentares RTE. No caso dos isolados agrupados no *subcluster* B e E, não representam um risco tão elevado para a saúde pública uma vez que os isolados agrupados com elevada percentagem com os isolados clínicos foram obtidos, respectivamente, de peixe e superfície do matadouro; o mesmo não acontece com os isolados agrupados no *subcluster* C e D, que foram obtidos a partir de superfícies do hipermercado na zona da gastronomia e de queijo, respectivamente.

Observamos ainda que, de uma forma geral, *Listeria* spp. se encontra altamente disseminada em todos os ambientes, uma vez que não ocorreu a formação de um *cluster* específico de isolados do mesmo local de amostragem. Esta observação é consistente com o estudo de Ruiz-Bolivar *et al.*, 2011. O facto de se encontrar altamente disseminada potencializa um possível surto esporádico ou até mesmo epidémico de listeriose, mas claro está que existem outros factores a ter em conta para tal acontecer, como a origem das estirpes, o hospedeiro e a capacidade que a estirpe possui de persistir e provocar doença, que está dependente, por exemplo, da produção de factores de virulência e da sua susceptibilidade a antibióticos para tratamento de listeriose. Assim, na tentativa de melhor esclarecer qual o potencial de patogenicidade das estirpes *Listeria* em análise, procedeu-se à avaliação da sua susceptibilidade a antibióticos e pesquisou-se a presença/produção de factores de virulência.

## 2.6. Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade a 11 agentes antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão, usando os *breakpoints* de resistência de *Staphylococcus* spp. estabelecido pelo CLSI, 2007, uma vez que não existem critérios estabelecidos para *Listeria* spp. e em vários estudos os *breakpoints* para *Staphylococcus* spp. são os utilizados (Chen *et al.*, 2010; Conter *et al.*, 2009; Davis e Jackson, 2009).

O número de isolados resistentes para os antibióticos testados encontra-se representado na Figura 7. Foi realizada a distinção entre LNM e LM, uma vez que isolados LM representam um nível de risco mais elevado pois são responsáveis por listeriose humana mais frequentemente que as espécies patogénicas LNM.



**Figura 7.** Gráfico representativo do número de isolados resistentes, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22). LNM – *Listeria não-monocytogenes*; LM - *L. monocytogenes*.

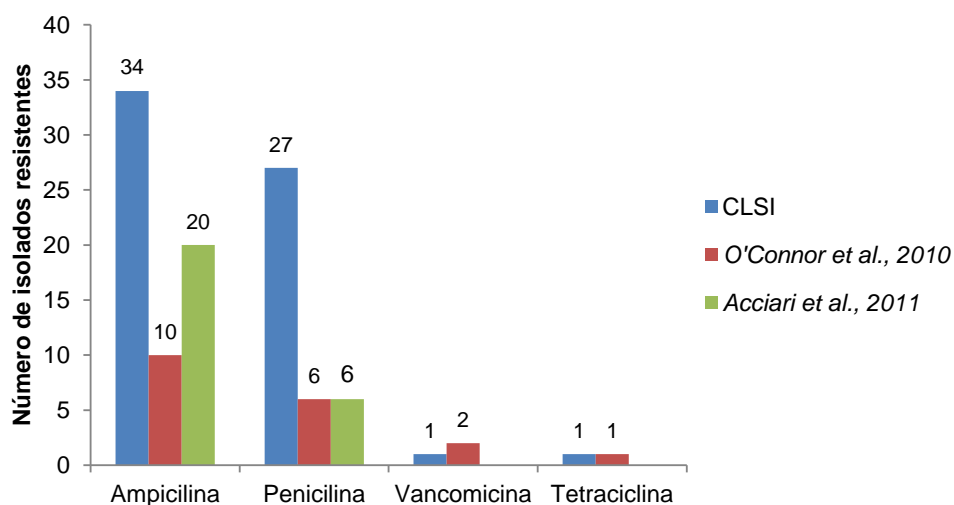
Ao analisarmos o número de isolados resistentes de uma forma global, verificamos que existe um número de resistências baixo, mas a uma gama de antibióticos elevada; pelo menos um isolado é resistente a todos os antibióticos testados, com exceção de cloranfenicol. Confirma-se então que, apesar de o número de resistentes ser baixo, existem resistências nos isolados de origem alimentar, de locais de processamento e clínicos, confirmando a afirmação de Lungu *et al.* (2011) que nos diz que desde a primeira descrição de isolados *Listeria* resistentes continua a existir um padrão contínuo de emergência de estirpes resistentes de *Listeria* isoladas de amostras alimentares, de locais de processamento dos mesmos e de casos clínicos de listeriose. Estas observações representam um elevado risco para a saúde pública, especialmente se existirem resistências aos antibióticos utilizados no tratamento de listeriose. Este caso é observado nos isolados deste trabalho, pois o maior número de resistências

observadas ocorre para dois antibióticos utilizados no tratamento de listeriose, a ampicilina e penicilina.

Aplicando a análise estatística do qui-quadrado na perspectiva de avaliar se os isolados LNM são mais resistentes aos antibióticos testados do que LM verificámos que as estirpes de LNM são mais resistentes à penicilina que LM ( $p < 0,05$ ). Relativamente às resistências observadas para os restantes antibióticos não existem diferenças estatisticamente significativas entre LNM e LM. Apesar de existir uma maior resistência à penicilina em LNM que em LM, não deixa de ser preocupante uma vez que poderão existir LNM patogénicas e existe ainda a possibilidade de os genes que conferem essas resistências serem transferidos para LM, conferindo assim risco acrescido para a saúde pública.

Segundo a definição de Magiorakos *et al.* (2011) para *Multi-Drug Resistant* (MDR) (não-susceptibilidade a um agente de pelos menos três classes de antibióticos com alvos diferentes), quatro estirpes LNM são MDR e os perfis de resistência observados foram os seguintes: AMP-CC-CIP-P, AMP-CC-E-P-RIF e AMP-CC-CIP-GM-P-RIF; e duas estirpes LM são MDR, com os perfis de resistência: AMP-CC-P-T e AMP-CC-GM-P-RIF. A emergência de estirpes MDR é uma preocupação para a saúde pública, uma vez que a probabilidade de um tratamento antimicrobiano funcionar é mais baixa, pois são resistentes a antibióticos com diferentes alvos. Estirpes de MDR não são comuns, mas a sua emergência tem sido descrita (Lungu *et al.*, 2011). Todos estes resultados indicam que é necessária a vigilância na prevalência e emergência de *Listeria* spp. resistentes e MDR em Portugal.

Adicionalmente, o facto de não existirem *breakpoints* de resistência antimicrobiana direcionados para *Listeria* spp. poderá influenciar o estudo da resistência em *Listeria* spp. Como a avaliação da susceptibilidade a antibióticos neste estudo teve como referência *breakpoints* para *Staphylococcus* spp. e como já existem alguns autores que determinaram alguns *breakpoints* para *Listeria* spp. (Anexo, Tabela A2), procedemos a avaliação das diferenças que poderão surgir no número de isolados resistentes quando utilizados diferentes *breakpoints* (Figura 8).



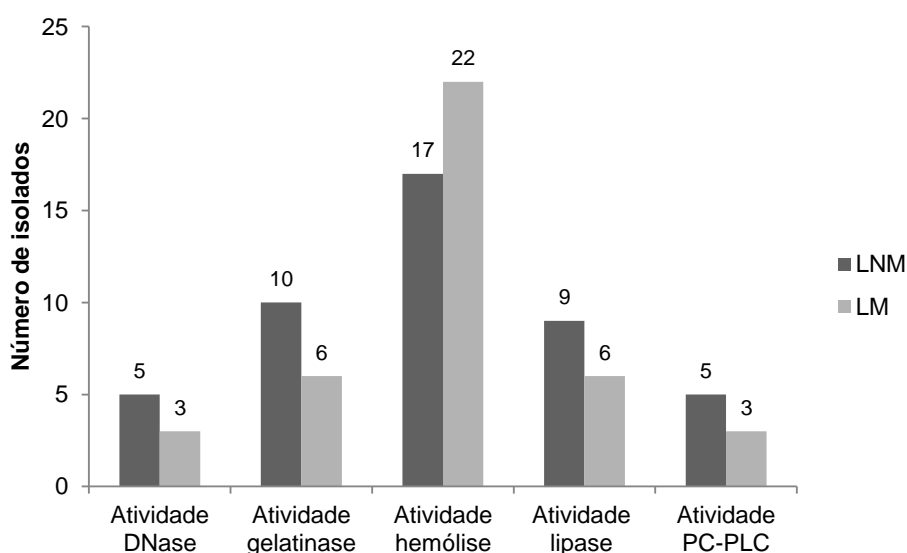
**Figura 8.** Gráfico representativo do número de isolados resistentes de *Listeria* spp., segundo os breakpoints de CLSI, 2007, O'Connor *et al.*, 2010 e Acciari *et al.*, 2011.

Observa-se que existem diferenças no número de resistentes e que, de uma forma geral, neste estudo possivelmente estaremos a admitir resistentes que na realidade não o são. Isto demonstra que são necessários estudos para determinar as referências específicas para *Listeria* spp., pois ao usarmos *breakpoints* de *Staphylococcus* spp. estamos a introduzir erros na avaliação da susceptibilidade a antibióticos.

## 2.7. Factores de virulência

A pesquisa de factores de virulência foi efetuada por ensaios em placa e/ou por amplificação de PCR.

Os ensaios em placa realizados foram: 1) atividade da gelatinase; 2) atividade da DNase; 3) atividade da hemolisina; 4) atividade da lipase e 5) atividade de PC-PLC. O número de isolados produtores destas atividades encontra-se representado na Figura 9. Foi realizada a distinção entre LNM e LM.



**Figura 9.** Gráfico representativo do número de isolados produtores de DNase, gelatinase, hemolisina, lipase e PC-PLC, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22), aos 11 antibióticos testados. LNM – *Listeria não-monocytogenes*; LM - *L. monocytogenes*.

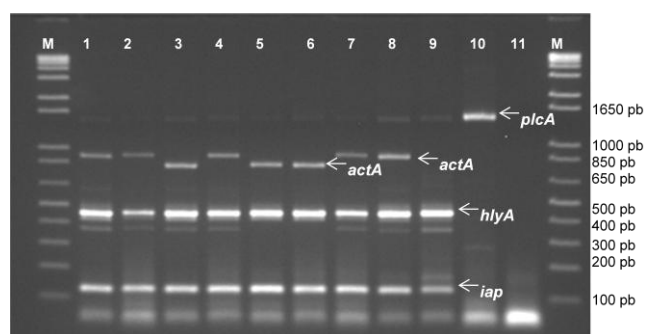
Observando os resultados obtidos e por análise estatística do qui-quadrado, as estirpes LM em estudo são mais produtoras de hemolisina, relativamente às estirpes de LNM ( $p < 0,05$ ). Nas restantes atividades estudadas não existem diferenças estatisticamente significativas entre LM e LNM. A hemólise é uma característica importante que parece estar relacionada com a patogenicidade de listeria, uma vez que *Listeria* spp. não-hemolíticas são praticamente consideradas não-patogénicas (Courtieu, 1991 em Aurora *et al.*, 2008). Assim, este resultado traduz-nos que os isolados LM em estudo são potencialmente mais patogénicos do que LNM, o que era esperado uma vez que nos isolados de LNM poderão estar presentes tanto listerias patogénicas como não-patogénicas. Sabe-se também que LM é produtora de uma hemolisina, LLO, que possui um papel importante durante o ciclo de infeção no hospedeiro, durante a fuga do vacúolo para a libertação da bactéria no citosol, sendo assim esperado que todos os

isolados de LM possuem atividade hemolítica. O elevado número de isolados LNM hemolíticos pode ser devido a alguns desses isolados pertencerem a espécies de *Listeria* spp. no qual já foram descritas hemolisinas, nomeadamente, *L. ivanovii* e *L. seeligeri* (Vázquez-Bolland *et al.*, 2001). Como o gene (*hlyA*) de LLO foi pesquisado, os resultados desta atividade serão, posteriormente, confrontados com os resultados da pesquisa desse gene. Os isolados produtores das outras atividades demonstraram algum potencial patogénico, na medida em que os isolados produtores da gelatinase poderão possuir a capacidade de hidrolisar o colagénio e certos péptidos bioativos no hospedeiro sugerindo a sua participação na iniciação e propagação de processos inflamatórios; os isolados produtores da lipase poderão possuir a capacidade de digerir lípidos celulares do hospedeiro para a aquisição de nutrientes resultando na morte das células do hospedeiro (Furumura *et al.*, 2006); e os isolados produtores da DNase poderão degradar a cromatina libertada pelos neutrófilos permitindo a sobrevivência ao sistema imunológico do hospedeiro (Brinkmann *et al.*, 2004).

Relativamente aos resultados da produção de PC-PLC, não se encontram de acordo com os estudos de Jaradah *et al.* (2002) onde todos os isolados de origem clínica e alimentar foram positivos para esta atividade, e no presente estudo foram poucos os isolados produtores de PC-PLC. Na avaliação do potencial patogénico, irá ser confrontada a origem dos isolados produtores e não-produtores desta fosfolipase, por forma a constatar, por exemplo, se estes serão isolados clínicos.

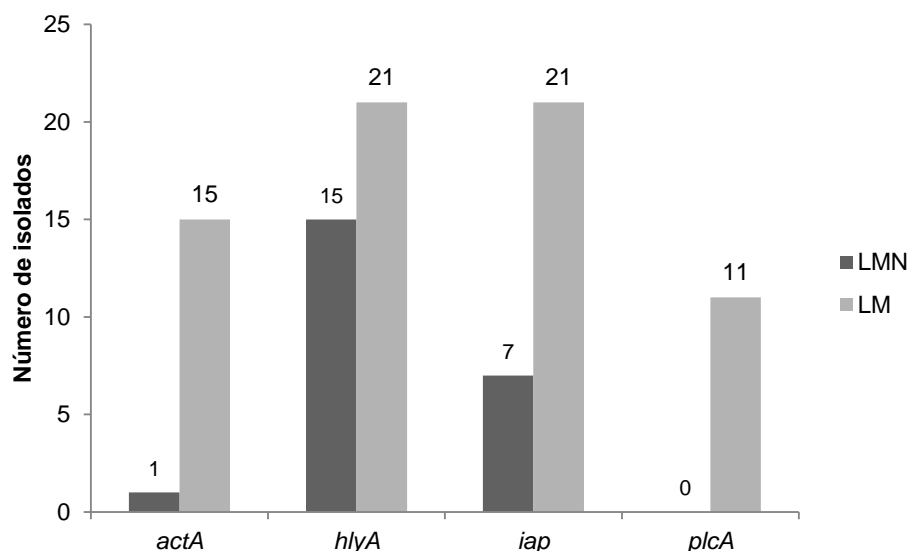
Na perspectiva de avaliar a virulência dos isolados, investigamos os genes responsáveis pela produção de factores de virulência chave no estabelecimento de *L. monocytogenes* no hospedeiro e que permitem que este provoque doença. Os genes em estudo foram combinados em duas reações de PCR-multiplex.

A reação de PCR-multiplex sugerido por Rawool *et al.* (2007) combina a amplificação de quatro genes: *actA*, *hlyA*, *iap* e *plcA*. Utilizando este método, os produtos amplificados para os isolados em estudo foram os representados na Figura 10.



**Figura 10.** Exemplo da reação de PCR-multiplex segundo Rawool *et al.* (2007) dos isolados testados neste estudo. Poço 1, LM7; Poço 2, CLIST2163; Poço 3, CLIST2167; Poço 4, AL LSMmac3; Poço 5 e 6, 4911; Poço 7, CEPAsv4b, Poço 8, CECT911; Poço 9, NCTC7973; Poço 10, CECT913<sup>T</sup>; Poço 11, controlo negativo da reação; M – marcador de massa molecular

O número de isolados que contêm estes genes encontra-se representado na Figura 11. Foi realizada a distinção entre LNM e LM.



**Figura 11.** Gráfico representativo do número de isolados detentores dos genes de virulência *actA*, *hlyA*, *iap* e *plcA*, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22). LNM – *Listeria não-monocytogenes*; LM - *L. monocytogenes*.

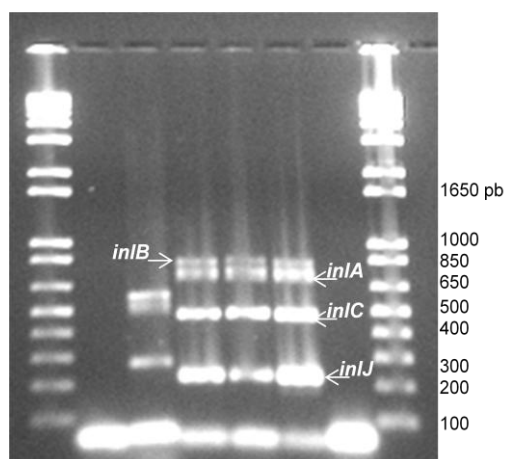
Os *primers* usados para pesquisar estes genes são descritos para LM. No entanto, existiram LNM que amplificaram com estes *primers*. Os resultados são consistentes com estudos em que espécies de LNM amplificaram o gene *actA*, *hlyA*, *iap* e *plcA* (Noterman *et al.*, 1999; Paziak-Domanska *et al.*, 1999; Vázquez-Boland *et al.*, 2001 em Rawool *et al.*, 2007), uma vez que algumas espécies LNM podem conter genes semelhantes aos encontrados em LM. Tendo em conta estes resultados, efetuamos a análise estatística do qui-quadrado onde presenciamos que os isolados LM em estudo são os maiores detentores, em relação a LNM, dos genes *actA*, *iap* e *plcA* ( $p < 0,05$ ). Relativamente ao gene *hlyA* não existem diferenças estatisticamente significativas entre LM e LNM.

Fazendo uma análise geral da pesquisa destes factores de virulência, observamos que tanto em LNM como em LM existe um polimorfismo relativamente à presença dos genes, na medida em que o número de isolados que possui cada um dos genes é variável. Nos estudos de Aurora *et al.* (2008), Rawool *et al.* (2008)(a) e Jallewar *et al.* (2007) também foi observado polimorfismo. Analisando o número de isolados que possui os genes *actA*, *hlyA* e *plcA*, uma vez que estes estão integrados em LIPI-1, era esperado que o número de isolados fosse o mesmo, o que não aconteceu. Uma vez que não sequenciámos a região do cromossoma, não é possível esclarecer se tal aconteceu devido a um defeito ou mutação na região LIPI-1.

Determinando a correlação entre o número de isolados produtores de hemolisina e os detentores do gene *hlyA* esta foi negativa. Para LNM 17 isolados foram produtores de hemolisina, contrastando com 15 isolados detentores de *hlyA*. No entanto, tal como já foi referido, o *primer* para *hlyA* é específico para LM e também poderão existir outras hemolisinas em LNM que não contenham um elevado grau de similaridade nucleotídica com LLO. Para LM, apenas um isolado é que não amplificou para o gene *hlyA*, mas como poderá ser visualizado

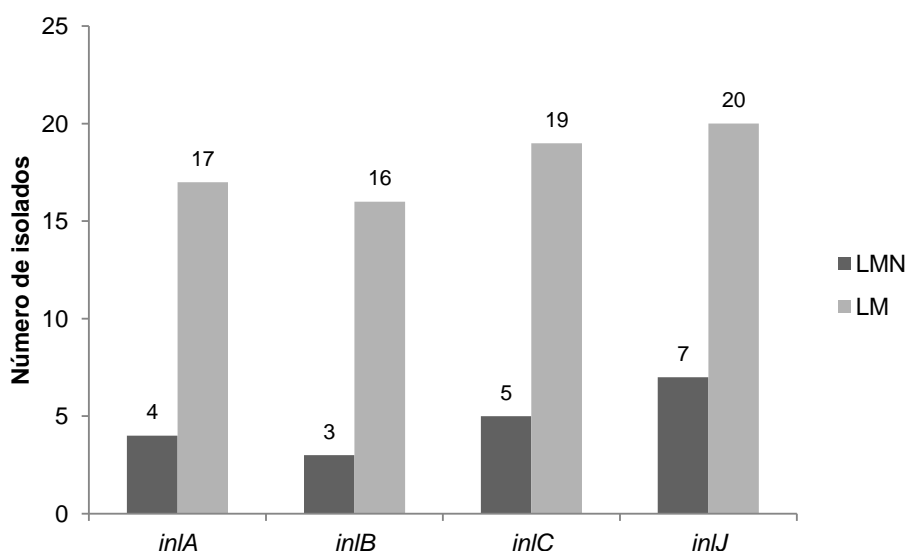
no ponto de discussão da avaliação de patogenicidade existiu um isolado de LM cujos *primers* não amplificaram para nenhum gene de virulência.

A outra reação de PCR-multiplex utilizada no presente estudo, sugerido por Liu *et al.* (2007), combina a amplificação de quatro genes: *inIA*, *inIB*, *inIC* e *inIJ*. Utilizando este método, os produtos amplificados para os isolados em estudo foram os representados na Figura 12.



**Figura 12.** Exemplo da reação de PCR-multiplex segundo Liu *et al.* (2007) dos isolados testados neste estudo. Poço 1, Ox LSJTRal 1; Poço 2, Ox LSJTLuv 3; Poço 3, F1; Poço 4, B2; Poço 5, CECT911; Poço 6, controle negativo da reação; M – marcador de massa molecular.

O número de isolados que contêm estes genes encontra-se representado na Figura 13. Foi realizada a distinção entre LNM e LM.



**Figura 13.** Gráfico representativo do número de isolados detentores dos genes de virulência *inIA*, *inIB*, *inIC* e *inIJ*, num total de isolados de LNM (n=19) e LM (n=22). LNM – *Listeria não-monocytogenes*; LM - *L. monocytogenes*.

Analisando o número de isolados detentores destes genes, tal como nos genes pesquisados na reação de PCR-multiplex referenciado anteriormente, apesar dos *primers* serem descritos para LM, também existiram LNM que amplificaram com os *primers*. Foi descrito, anteriormente,

que uma espécie LNM teve amplificação positiva para estes genes (Liu *et al.*, 2007) e que existem LNM que possuem internalinas homólogas com as internalinas de LM (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Também foi observado polimorfismo dos genes nos isolados.

Tendo em conta que os genes *inIA* e *inIB* são considerados proteínas de superfície espécie-específica para LM, analisámos o número de isolados LM e LNM que amplificaram para os mesmos: cinco isolados LM não amplificaram o gene *inIA* e seis o gene *inIB*; por outro lado quatro isolados LNM amplificaram para *inIA* e *inIB*. Existirem isolados de LM que não amplificaram para o gene *inIA*, não foi consistente com os estudos de Sant'Ana *et al.* (2012) e de Liu *et al.* (2007). No entanto Nightingale *et al.* (2005) já descreveram isolados de LM que possuem mutações no gene *inIA*. O gene *inIB*, não é muito pesquisado uma vez que Liu *et al.* (2007) identificou falhas na amplificação de LM dos serótipos 4. No próximo ponto será verificado se os isolados que não amplificaram para este gene são pertencentes ao serogrupo 4b-4e-4ab.

De forma a efetuar uma comparação entre LNM e LM, procedemos ao teste estatístico qui-quadrado e verificámos que o número de isolados LM possuem os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ* é maior em comparação com LNM ( $p < 0,05$ ), o mesmo não acontece relativamente ao gene *inIB*. Os isolados LM neste estudo demonstraram possuir mais determinantes de virulência (*actA*, *hlyA*, *iap*, *inIA*, *inIC* e *inIJ*) do que os isolados LNM, demonstrando assim representarem estirpes mais virulentas do que LNM, logo potencialmente mais patogénicos. No entanto, para esclarecer e avaliar o potencial patogénico dos isolados em estudo terá que se efetuar a integração da disseminação dos isolados no ambiente e a sua origem, as resistências observadas e os fatores de virulências que possuem.

## **2.8. Potencial de patogenicidade**

Quanto maior for o número de características, que permitem que *Listeria* spp. sejam potencialmente patogénicas, maior será o potencial patogénico associada aos isolados, e maior será o risco associado para a saúde pública. Assim, analisando as características dos isolados clínicos, vamos examinar se o potencial patogénico dos isolados dos três locais de amostragem e dos isolados de origem alimentar fornecidos é elevado. Para melhor visualização dos resultados, foi construído um dendrograma que associa uma matriz de dados booleanos considerando a presença/ausência de resistência a antibióticos e factores de virulência, com os dados de perfis de bandas utilizados na tipificação por métodos moleculares. A Figura 14 é uma adaptação da informação obtida a partir do dendrograma.

Tipificação por métodos moleculares			Expressão de factores de virulência					Presença de genes de virulência										Resistências											Identificação por métodos moleculares	
Identificação método molecular	ERIC	csM13	DNase	Gelatinase	Hemólise	Lipase	PC-PLC	actA	hlyA	iap	inlA	inlB	inlC	inlJ	plcA	AMP	P	VA	C	CIP	CC	E	GM	RD	SXT	T	Identificação por métodos moleculares	Origem	Código	
																										LNM	n.a	Matadouro de suínos, chão, zona de corte	Ox LSMch 1 1	
																										LNM	n.a	Hipermercado, tabuleiro, zona da gastronomia	Ox LSJGTab 2	
																										LNM	n.a	Hipermercado, faca, zona talho	Ox LSJTFac 1	
																										LNM	n.a	Fábrica de queijos, luva dos trabalhadores, zona de embalagem	AL Lslu-I.3.1	
																										LNM	n.a	Hipermercado, carne, zona talho	AL LSJCar 1	
																										LNM	n.a	Matadouro de suínos, maçaneta, zona de corte	AL LSMmac 4	
																										LNM	n.a	Fábrica de queijos, salmoura	Ox LASal	
																										LNM	n.a	Hipermercado, carne, zona talho	AL LSJCar 3	
																										LNM	n.a	Matadouro de suínos, maçaneta, zona de corte	AL LSMmac 2	
																										LNM	n.a	Hipermercado, ralo lava-loiça, zona gastronomia	AL LSJGRal* 2	
																										LNM	n.a	Hipermercado, ralo chão, zona talho	AL LSJTRal 2	
																										LNM	n.a	Matadouro de suínos, ralo chão, zona túnel refrigeração	AL LSMral II 2	
																										LNM	n.a	Hipermercado, carapau, zona peixaria	AL LSJCP 2	
																										LNM	n.a	Hipermercado, ralo chão, zona talho	Ox LSJTRal 1	
																										LNM	n.a	Fábrica de queijos, ralo chão, zona maturação	AL LSRa-II 1	
																										LNM	n.a	Fábrica de queijos, água não tratada	AL LWnt	
																										LNM	n.a	Hipermercado, ralo chão, zona talho	AL LSJTRal 3	
																										LNM	n.a	Hipermercado, lombo assado, zona gastronomia	AL LAJLom 1	
																										LNM	n.a	Hipermercado, lombo assado, zona gastronomia	AL LAJLom 2	
																										LM	1/2a-3a	Fábrica de queijos, luva dos trabalhadores, zona de embalagem	AL LSLu-I 3.2	
																										LM	1/2a-3a	Hipermercado, tabuleiro, zona da gastronomia	AL LSJGTab 3	
																										LM	1/2c-3c	Amostra líquido cefalorraquidiano, Brasil	CLIST2164	
																										LM	1/2c-3c	Hipermercado, tabuleiro, zona da gastronomia	AL LSJGTab 4.2	
																										LM	1/2a-3a	Amostra sangue, Dinamarca	4256	
																										LM	1/2a-3a	Amostras alimentares, Espanha	B2	
																										LM	1/2a-3a	Amostras alimentares, Espanha	F1	
																										LM	1/2a-3a	Amostras alimentares, Portugal	LM10	
																										LM	1/2a-3a	Amostras alimentares, Espanha	A3	
																										LM	1/2a-3a	Hipermercado, tabuleiro, zona da gastronomia	AL LSJGTab 2	
																										LM	1/2a-3a	Hipermercado, luva trabalhador, zona talho	Ox LSJTLuv 3	
																										LM	1/2a-3a	Hipermercado, faca, zona talho	AL LSJTFac 2	
																										LM	1/2a-3a	Amostras alimentares, Espanha	L8	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra sangue, Portugal	PCUA158	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra líquido cefalorraquidiano, Brasil	CLIST2162	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra sangue, Dinamarca	4911	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra sangue, Brasil	CLIST2163	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra líquido cefalorraquidiano, Brasil	CLIST2167	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostras alimentares, Portugal	LM7	
																										LM	4b-4e-4ab	Amostra clínica	CEPAsv4b	
																										LM	4b-4e-4ab	Matadouro de suínos, maçaneta, zona de corte	AL LSMmac enr. 2	
																										LM	1/2a-3a	Matadouro de suínos, ralo chão, zona de corte	AL LSMral I 2	

**Figura 14.** Esquema representativo contendo a identificação dos isolados e as suas respectivas características, nomeadamente a expressão de atividades enzimáticas, a pesquisa de genes de virulência e a resistência a 11 antibióticos testados. Os isolados clínicos encontram-se assinalados a vermelho e os isolados alimentares/superfícies de produtos RTE encontram-se assinalados a verde.

Os isolados clínicos encontram-se assinalados a vermelho. O isolado CLIST2164, além de ser susceptível a todos os antibióticos testados, não amplificou para os genes *inIA*, *inIB* e *inIC*. Estes resultados devem corresponder a verdadeiros negativos pois observou-se a amplificação dos restantes genes testados. Em contrapartida o isolado foi positivo para a expressão da gelatinase, da lipase e da hemolisina; os isolados 4256 e a CEPAsv4b amplificaram para todos os genes de virulência pesquisados, e o isolado CEPAsv4b foi positivo para as atividades da gelatinase, lipase e hemolisina; os isolados PCUA158 e CLIST2162 apenas não amplificaram para o gene *plcA*; os isolados 4911 e CLIST2163 apenas não amplificaram *inIB*, CLIST2167 além da falta do gene *inIB* também não amplificou para o gene *inIA*. Estes últimos seis isolados mencionados (4256, PCUA158, CLIST2162, 4911, CLIST2163 e CLIST2167) apenas apresentaram atividade da hemolisina.

Os factores mais críticos para os passos sucessivos do processo de infeção incluem InIA e InIB para o processo de entrada e LLO para o escape do vacúolo. Mais especificamente, InIA medeia a entrada de LM nas células epiteliais, e InIB facilita a entrada de LM num maior tipo de células do hospedeiro. Em algumas células, LLO não é eficiente e a lise do vacúolo é efetuada por PI-PLC (Cossart *et al.*, 2008). Posto isto, seria suposto que alguns destes isolados não seriam capazes de invadir o hospedeiro, uma vez que não conseguiriam ultrapassar a barreira intestinal bem como outras barreiras. No entanto, poderão ter o potencial de produzir doença quando as funções do sistema imunitário do hospedeiro estão suprimidas, ou então quando as estirpes são transmitidas via intravenosa (Liu *et al.*, 2007). É importante referir também que o isolado CLIST2164 não possui os genes *inIA*, *inIB* e *inIC*, mas possui atividades hemolítica, gelatinase e lipase, ou seja poderá possuir a capacidade de hidrolisar o colagénio e certos péptidos bioativos assim como a capacidade de digerir lípidos das células do hospedeiro, aumentando assim a sua capacidade de entrada nas células, já que não possui três internalinas.

Efetuada então a comparação do perfil dos isolados clínicos com os restantes isolados, observamos que os isolados LM são os que possuem o perfil mais idêntico, com a exceção de dois isolados LNM, Ox LSJGTab 2 e AL LSJCP, que são os isolados LNM que possuem um maior potencial patogénico. Os isolados LNM, de uma forma geral, não apresentaram mais de quatro genes de virulência, e foram detetadas até cinco atividades de factores de virulência.

No entanto, os isolados com maior risco associado para a saúde pública serão aqueles cuja origem provém de alimentos/superfícies de produtos alimentares RTE. Encontram-se assinalados a amarelo todos os isolados com essa origem. Associando a esses isolados as características que os isolados clínicos possuem, os que representam um maior risco para a saúde pública, e portanto um maior potencial patogénico associado, são: Ox LSJGTab 2, AL LSJGTab 4.2, LM10, AL LSJGTab 2 e LM7. A estes isolados, com exceção de AL LSJGTab 4.2, é acrescentado um maior potencial patogénico uma vez que são resistentes a pelo menos um antibiótico de escolha para o tratamento de listeriose; AL LSJGTab 2 possui um potencial ainda maior uma vez que é um isolado MDR; e LM7 que possui o serogrupo (4b-4e-4ab) associado aos serotipos da linhagem III, ou seja, os responsáveis por listerioses epidémicas.

Na discussão da análise do dendrograma global na tipificação por métodos moleculares, foram realçados isolados com elevada percentagem de semelhança com os isolados clínicos. Desses isolados, temos quatro representativos: AL LSlu-I 3.2, LM10, AL LSJGTab e LM7. Foram retiradas conclusões em relação ao seu potencial patogénico através da percentagem de semelhança dos perfis de bandas obtidos; com exceção de AL LSlu-I 3.2, que demonstrou poder ser a única estirpe avirulenta (sem genes de virulência), as conclusões retiradas comprovam-se, uma vez que são as estirpes mais virulentas da coleção. Nos estudos de Kaur *et al.* (2007) e (2009) também existiram isolados de LM que não amplificaram para os genes de virulência sendo assim classificados como estirpes LM atípicas.

Na discussão dos factores de virulência, ficaram duas “questões” por resolver, nomeadamente a atividade PC-PLC e a presença do gene *inlB*. Relativamente à expressão de PC-PLC, e tendo em conta que o potencial de patogenicidade de *Listeria* spp. pode ser avaliado por PC-PLC (Yadav *et al.*, 2008), observamos que apenas cinco isolados LNM e três LM foram produtores de PC-PLC mas nenhum isolado clínico foi. Assim, não podemos afirmar que pelo facto de não terem expressado PC-PLC não são potenciais patogénicos, uma vez que sabemos que isolados clínicos já foram patogénicos. A justificação para tal pode ser devido aos factores de virulência serem principalmente requeridos para colonizar o tecido animal e para superar os mecanismos de defesa do hospedeiro durante a infeção, e a sua síntese fora do hospedeiro pode representar um “fardo” que compromete a capacidade das estirpes de *Listeria* sobreviverem no ambiente natural e limitar o potencial de transmissão, possuindo assim mecanismos que suprimem a produção de alguns factores de virulência (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Relativamente à presença de *inlB*, temos que dos três serogrupos em estudo, pelo menos um isolado não amplificou para o gene *inlB*, e de oito isolados 4b-4e-4ab, apenas três não amplificaram para 4b-4e-4ab.

### 3. Conclusões

A concretização dos vários pontos do objetivo do presente trabalho, permitiu-nos tirar várias ilações:

1) Os métodos de identificação por métodos fenotípicos demonstraram não ser suficientes para uma identificação segura; no entanto para uma fase inicial são úteis uma vez que fazem uma seleção de isolados presuntivos, e permite reduzir tempo e custos nos métodos genotípicos. A tipificação por métodos moleculares demonstrou ser bastante vantajosa, na medida que em que conseguimos escolher os representantes de cada tipo e observar a disseminação dos isolados em estudo. Os resultados obtidos destas técnicas permitiram-nos observar que nos três locais de amostragem tanto LNM como LM se encontram presente, tendo sido encontrados serogrupos de LM com serótipos pertencentes às linhagens mais preocupantes (I e II), o que por si só já acarreta um certo risco para a saúde pública. Juntamente a esse facto, os isolados da coleção demonstraram estar altamente disseminados em ambientes distintos, existindo alguns isolados com origem alimentar/superfície com mais risco associado (produtos alimentares RTE e/ou ambientes associados aos mesmos), com uma elevada percentagem de semelhança com os isolados clínicos.

2) De uma forma geral os isolados de *Listeria* demonstraram ser susceptíveis aos antibióticos. No entanto, observou-se a emergência de resistentes a dois antibióticos utilizados no tratamento de listeriose (Ampicilina e Penicilina) e de MDR, indicando que é necessária a vigilância na prevalência e emergência de *Listeria* spp. resistentes e MDR em Portugal. Foi demonstrado que ao utilizarmos *breakpoints* de *Staphylococcus* spp., estamos a introduzir erros na avaliação da susceptibilidade a antibióticos, sendo necessários mais estudos para determinar *breakpoints* específicos de *Listeria* spp.

3) Os isolados de LNM demonstraram ser menos virulentos que LM, o que seria de esperar uma vez que nos isolados identificados como LNM poderão estar incluídas espécies de *Listeria* patogénicas e também não-patogénicas. Os perfis observados vão desde a presença de pelo menos um factor de virulência a todos os factores de virulência testados. Através da pesquisa destes factores conseguimos perceber a virulência que os isolados acarretam e assim avaliar o potencial patogénico associado.

4) A integração de todos os resultados obtidos permitiu-nos observar qual o potencial patogénico dos isolados em estudo, através da comparação com as características dos isolados clínicos. Assim, observámos que existem isolados com elevado potencial patogénico independentemente de serem LNM ou LM, e da sua origem. A construção de um dendrograma com base numa matriz de dados booleanos relativos à presença/ausência de resistência a antibióticos e factores de virulência, demonstrou ser uma ferramenta bastante vantajosa para a integração de todos os resultados e visualização dos mesmos de uma forma global.

#### 4. Referências

- Abuin F. C. M., Fernandez Q. E. J., Sampayo F. C., Otero R. J. L., Rodriguez L. D., Saez A. C. (1994). Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38:1655–1657.
- Alonzo F., Port G. C., Cao M., Freitag N. E. (2009). The posttranslocation chaperone prsA2 contributes to multiple facets of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77(7):2612-2623.
- Altuntas E.G., Kocan D., Cosansu S., Ayhan K., Juneja V.K. and Materon L. (2012). Antibiotic and Bacteriocin Sensitivity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Different Foods. *Food and Nutrition Sciences* 3(3): 363-368.
- Ana Leça (2012) *Listeria* e Listeriose: avaliação do risco, perspectiva da DGS. Seminário *Listeria* e listeriose “LISRISK” – Risk assessment of *Listeria* in traditional ready-to-eat food items. IPIMAR.
- Anónimo. (2011). Scientific report of EFSA and ECDC, The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *EFSA Journal*, 9(3):2090.
- Arpin C., Carlier C., Courvalin P., and Quentin C. (1992). Analysis of an antibiotic resistance plasmid from a clinical isolate of *Listeria monocytogenes*, abstr. 26/C3. 12 Reunion Interdisc. Chimiothér. Anti-Infect., Paris, France.
- Atil E., Ertas H.B. and Ozbey G. (2011). Isolation and molecular characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environmental samples. *Veterinari Medicina* 56 (8): 386–394.
- Aurora R., Prakash S., Rawool D.B., Barduddhe S. B. (2008). Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenic tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 19:641-647.
- Bhat S. A., Willayat M. M., Roy S. S., Bhat M. A., Shad S. N., Ahmed A., Maqbool S., Ganayi B. A. (2012). Isolation, molecular detection and antibiograma of *Listeria monocytogenes* from human clinical cases and fish of Kashmir, India. Springer.
- Bakker H.C., Bundrant B.N., Fortes E.D., Orsi R.H., Wiedmann M. (2010). A population genetics-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(18): 6085-6100.
- Becker B., Schuler S., Lohneis M., Sabrowski A., Curtis G.D., Holzapfel W.H. (2006). Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2): 127-131.
- Bertrand S., Huys G., Yde M., D'Haene K., Tardy F., Vrints M., Swings J., Collard J.M. (2005). Detection and characterization of tet(M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. *Journal of Medical Microbiology*, 54(12): 1151-1156.
- Blackman I. C. and Frank J. F. (1996). Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 59 (8):827-831.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D. S., Weinrauch Y. and Zychlinsky A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 303:1532-1535.
- Bubert A., Hein I., Rauch M., Lenher A., Yonn B., Goebe W., Wagner M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10):4688-4692.
- Chae, M.S. and Schraft, H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62:103–111.
- Chambel L., Sol M., Fernandes I., Barbosa M., Zilhão I., Barata B., Jordan S., Perni S., Shama G., Adrião A., Faleiro L., Requena T., Peláez C., Andrew P.W., Tenreiro R. (2007). Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1): 52–63.
- Charpentier E., Gerbaud G., Jacquet C., Rocourt J., Courvalin P. (1995). Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Journal Infection Disease*, 172:277–281.
- Charpentier E., Courvalin P. (1999). Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(9): 2103–2108.
- Chen B.Y., Pyla R., Kim T.J., Silva J.L., Jung Y.S. (2010). Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish filets and processing environment. *Letters in Applied Microbiology*, 50(6): 626-632.
- Collins, M.D., Wallbanks, S., Lane, D.J., Shah, J., Nietupski, R., Smida, J., Dorsch, M., Stackebrandt, E. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *International Journal Systematic Bacteriology*, 41:240–246.
- Conter M., Paludi D., D'Orío V., Vergara A., Ianieri A. (2007). Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and food processing environment. *Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, 17:157-164.

- Conter M., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A. and Ianieri A. (2009). Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 128(3): 497-500.
- Cossart P., Toledo-Arana A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and Infection* 10(9): 1041-1050.
- Courtieu, A. L. (1991). Latest news on listeriosis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 14:1-7.
- Davis J.A., Jackson C.R. (2009). Comparative Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, and *L. welshimeri*. *Microbial Drug Resistance* 15(1): 27-32.
- Ecker D.J., Sampath R., Willett P., Wyatt J.R., Samant V., Massire C., Hall T.A., Hari K., McNeil J.A., Büchen-Osmond C., Budowle B. (2005). The microbial rosetta stone database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiology* 5: 19.
- Euzéby J. P. List of prokaryotic name with standing in nomenclature-genus *Listeria* [<http://www.bacterio.cict.fr//listeria.html> Acedido a13/07/2012].
- Facinelli, B., Giovanetti E., Varaldo P. E., Casolari P., Fabio U. (1991). Antibiotic resistance in foodborne listeria. *Lancet* 338:1272.
- Facinelli, B., Roberts M. C., Giovanetti E., Casolari C., Fabio U., Varaldo P. E. (1993). Genetic basis of tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:614-616.
- Franco A. C. M., Fernandez E. J. Q., Sampayo C. F., Otero J. L. R., Rodriguez L. D., Saez A. C. (1994). Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 38:1655-1657.
- Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kolarec, K., Delaš, F. (2010). Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. *Journal Dairy Research*, 77:112-116.
- Furrer B., Candrian U., Hoefelein C., Luethy J. (1991). Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 372-379.
- Furumura M. T., Figueiredo P. M.S., Carbonell G. V., Darini A. L. C., Yano T. (2006). Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:230-236
- Gelbíčová T., Kaříšková R. (2012). Outdoor Environment as a Source of *Listeria monocytogenes* in Food Chain. *Czech Journal of Food Sciences*, 30(1): 83-88.
- Gilot P., Gevicot A., André P. (1996). Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and human patients with listeriosis. *Journal of clinical microbiology*, 34(4):1007-1010.
- Gravani R. (1999). Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In *Listeria, listerioses and food safety*. Pyser E. T., Marth E. H. Pp657-710. New-York. Marcel Dekker.
- Hadorn K. H., Schaffner A., and Kayser F. H. (1993). Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12:928-937.
- Hain T., Steinweg C. and Chakraborty T. (2006). Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology*, 126(1): 37-51.
- Harakeh, S., Saleh I., Zouhairi O., Baydoun E., Barbour E., Alwan N. (2009). Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the Total Environment*, 407:4022-4027.
- Hadorn, K., Haehler H., Schaffner A., Kayser F. H. (1993). Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. *European Journal Clinical Microbiology Infection Diseases*, 12:928-937.
- Heras A., Cain R.J., Bielecka M.K., Vázquez-Boland J.A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2): 118-27.
- Hernando A., Prieto M., García-Fernández C., Alonso-Calleja C., Capita R. (2012) Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control*, 23: 37-41.
- Indrawattana N., Nibaddhasobon T., Sookrung N., Chongsa-Nguan M., Tungtrongchitr A., Makino S., Tungyong W., Chaicumpa W. (2011). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. *Journal of Health Population and Nutrition*, 29(1): 26-38.
- Ivanov I, Masalski N, Marsnova A. (1982). Decarboxylase and hemolytic activity of *Listeria*. *Veterinarno-Meditsinski nauki*, 19:45-50.

- Jadhav S., Bhawe M., Palombo E.A. (2012). Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 88(3): 327-341.
- Jallewar P.K., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Pande V.V., Barbudde S.B. (2007). Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1): 120-123.
- Jaradat Z. W., Schutze G. E., Bhunia A. K. (2002). 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*, 76:1-10.
- Jeyaletchumi P., Tunung R., Margaret S.P., Son R., Farinazleen M.G., Cheah Y.K. (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*, 17: 1-11.
- Kaur S., Malik S.V., Vaidya V.M., Barbudde S.B. (2007). *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5): 1889-1896.
- Kaur S., Malik S.V., Bhilegaonkar K.N., Vaidya V.M., Barbudde S.B. (2009). Use of a phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp. *The Veterinary Journal*, 184(3): 366-370.
- K rouanton A., Marault M., Petit L., Grout J., Dao T.T., Brisabois A. (2010). Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. *Journal of Microbiological Methods*, 80(2): 134-137.
- Kova evi  J., Mesak L.R., Allen K.J. (2012). Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology*, 30(2): 372-378.
- Leclercq (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *Journal of Microbiological Methods*, 57(2): 251-258.
- Leite P., Rodrigues R., Ferreira M., Ribeiro G., Jacquet C., Martin P., Brito L. (2005). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *International Journal of Food Microbiology*, 106(2): 111-121
- Li Q., Sherwood J.S., Logue C.M. (2006). Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1): 86-91.
- Liu D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6): 645-59.
- Liu D., Lawrence M.L., Austin F.W., Ainsworth A.J. (2007). A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 71(2): 133-140.
- Lukinmaa S., Aarnisalo K., Suihko M.L., Siitonen A. (2011). Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates of human and food origin studied by serotyping, automated ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10:562-568.
- Lungu B., O'Bryan C. A., Muthaiyan A., Milillo S. R., Johnson M. G., Crandall P. G., Ricke S. C. (2011). *Listeria monocytogenes*: Antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8 (5):569-578.
- MacGowan A. P., Reeves D. S., McLauchlin J. (1990). Antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, 336:513-514.
- Maklon K., Minami A., Kusumoto A., Takeshi K., Nguyen T.B., Makino S., Kawamoto K. (2010). Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from commercial asazuke (Japanese light pickles). *International Journal of Food Microbiology*, 139(3): 134-139.
- Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18: 268-281.
- Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCarg L. F., Bresee J. S., Shapino C., Griffin P. M., Tauxe R. V. (1999). Food-related illness and death in United States. *Emerging Infection Diseases*, 5:607-625.
- Morvan A., Moubareck C., A. Leclercq A., Hervé-Bazin M., Bremont S., Lecuit M., Courvalin P., Le Monnier A. (2010) Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6): 2728-2731.
- Neves E., Silva A.C., Roche S.M., Velge P. and Brito L. (2008). Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. *Journal of Medical Microbiology*, 57(4): 411-41.
- Nightingale, K.K., Windham, K., Martin, K.E., Yeung, M., Wiedmann, M. (2005). Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. *Applied Environmental Microbiology*, 71: 8764-8772.
- Notermans S.H.W., Dufrenne J., Leimeister-Wachter M., Domann E., Chakraborty T. (1991). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Applied Environmental Microbiology*, 57:2666-2670.

- O'Connor L., O'Leary M., Leonard N., Godinho M., O'Reilly C., Coffey L., Egan J., O'Mahony R. (2010). The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. *Letters in Applied Microbiology*, 51(5): 490-498.
- Orsi R.H., Bakker H.C., Wiedmann M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International journal of Medical Microbiology*, 301(2): 79-96.
- Paziak-Domanska B., Bogulawska E., Wiekowska-Szakiel M., Kotlowski R., Rozalska B., Chmiela M., Kur J., Dabrowski W., Rudnicka W. (1999). Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. *FEMS Microbiology Letters*, 171:209-214.
- Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A. (2010). Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail food. *Food Control*, 21:708-713.
- Poyart-Salmeron C., Carlier C., Trieu-Cuot P., Courtieu A.-L., Courvalin P. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet*, 335:1422-1426.
- Poyart-Salmeron C. P., Trieu-Cuot C. C., MacGowan A., McLauchlin J., Courvalin P. (1992). Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 36:463-466.
- Quentin C., Thibaut M. C., Horovitz J., Bebear C. (1990). Multiresistant strain of *Listeria monocytogenes* in septic abortion. *Lancet*, 336-375.
- Rawool D.B., Malik S.V., Shakuntala I., Sahare A.M., Barbuddhe S.B. (2007). Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *International Journal of Food Microbiology*, 13(2): 201-207.
- Rawool D.B., Malik S.V.S., Barbuddhe S.B., Shakuntala I., Aurora R. (2007). A Multiplex PCR for Detection of Virulence Associated Genes in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Safety*, 9: 56-62.
- Reis C.M., Barbosa A.V., Rusak L.A., Vallim D.C., Hofer E. (2011). Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(2): 173-176.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. pp. 1-20 in: Ryser, E.T., Marth, E. *Listeria*, listeriosis, and food safety, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York.
- Roberts A, Nightingale K, Jeffers G, Fortes E, Kongo JM, Wiedmann M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology*, 152 (3): 685-693.
- Ruiz-Bolivar Z., Carrascal-Camacho A.K., Neuque-Rico M.C., Gutiérrez-Triviño C., Rodríguez-Bocanegra M.X., Poutou-Piñales R.A., Mattar S. (2011). Enterobacterial repetitive intergenic consensus- polymerase chain reaction (ERIC-PCR) fingerprinting reveals intra-serotype variations among circulating *Listeria monocytogenes* strains. *African Journal of Microbiology Research*, 5(13): 1586-1598.
- Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Quinn, F., Mabilat, C. (1996). Comparative analysis of 16S and 23 S rRNA sequences of *Listeria* species. *International Journal Systematic Bacteriology*, 46: 669-674.
- Sant'Ana A.S., Igarashi M. C., Landgraf M., Destro M. T., Franco B. D. G. M. (20012). Prevalence, populations and phenotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 155:1-9.
- Slade P. J., Collins-Thompson D. L. (1990). *Listeria*, plasmids, antibiotic resistance, and food. *Lancet*, 336-1004.
- Stuart S, Welshimer H. (1974). Taxonomic reexamination of *Listeria Pirie* and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus, *Murraya*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 24:177-185.
- Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3): 584-640.
- Velge p., Roche S. M. (2010). Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? *Future Microbiology*, 5 (12): 1799-1821.
- Vos P. D., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B.. (2009). Volume III, The Firmicutes. Pp. 244-256 in: Whitman W. B., and Parte A. C. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition. Springer.
- Wang F.I., Chern M.K., Wang C., Yan M., Hsieh Y.H. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in food products in Taipei, Taiwan. *African Journal of Microbiology Research*, 6(22): 4702-4706.
- Ward T. J., Ducey T. F., Usgaard T., Dunn K. A., Bielawski J. P. (2008). Multilocus genotyping assay for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:7629-7642.

Yan H., Neogi S. B., Mo Z., Guan W., Shen Z., Zhang S., Li L., Yamasaki S., Shi L., Zhang N. (2010). Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. *International Journal of Food Microbiology*, 114 (2): 310-316.

Zar, J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. 3rd edition. Prentice-Hall International Editions. London, United Kingdom.

## Anexo

**Tabela A 1.** Informação mais detalhada das reações de PCR-multiplex para identificação por métodos moleculares e da pesquisa dos genes de virulência.

Gene ( <i>locus</i> )	Tamanho do fragmento (pb)	Estirpes controlo positivo	Sequência (5'-3')	Referência
<i>Imo1118</i> (proteína hipotética)	906	CECT911	AGGGCTTCAAGGACTTACCC ACGATTCTGCTTGCCATT	Kérounton et al., 2010
<i>Imo0737</i> (proteína hipotética)	691	CECT911, NCTC7939, CECT4031 <sup>T</sup> , CECT932	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA CGGCTTGTTCCGCATACTTA	
<i>orf2110</i> (serina protéase)	597	CECT935	AGTGGACAATTGATTGGTGAA CATCCATCCCTTACTTTGGAC	
<i>orf2819</i> (n.a)	471	CECT935, CECT937,	AGCAAAATGCCAAAACCTCGT CATCACTAAAGCCTCCCATTG	
<i>prs</i> (rRNA16S Género)	370	CECT911, NCTC7939, CECT4031 <sup>T</sup> , CECT932, CECT935, CECT937, CECT913 <sup>T</sup> , CECT919 <sup>T</sup> , CECT931 <sup>T</sup> , CECT917 <sup>T</sup> , CECT910 <sup>T</sup> , CECT934	GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTGCGG	
LIP1 E LIP2a (regulador de <i>L. monocytogenes</i> )	274	CECT911, NCTC7939, CECT4031 <sup>T</sup> , CECT932, CECT935, CECT937, CECT934	GATACAGAAACATCGGTTGGC GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	
<i>plcA</i> (PI-PLC)	1483	CECT913 <sup>T</sup> , NCTC7939,	CTGCTTGAGCGTTCATGTCTCATCCCC ATGGGTTTCACTCTCCTTCTAC	Rawool et al., 2007
<i>actA</i> (actina)	944, 839	CECT913 <sup>T</sup> , NCTC7939,	CGCCGCGGAAATTAATAAAGA ACGAAGGAACCGGGCTGCTAG	
<i>hlyA</i> (LLO)	456	NCTC7939	GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG	
<i>iap</i> (proteína de invasão)	130	NCTC7939	ACAAGCTGCACCTGTTGCAG TGACAGCGTGTGTAGTAGCA	
<i>inIA</i> (internalina A)	800	CECT934, CECT911	ACGAGTAACGGGACAAATGC CCCACAGTGGTGTAGATT	Liu et al., 2007
<i>inIB</i> (internalina B)	884	CECT911	TGGGAGAGTAACCCAACCAC GTTGACCTTCGATGGTTGCT	
<i>inIC</i> (internalina C)	517	CECT911, CECT913	AATCCCACAGGACACAACC CGGGAATGCAATTTTCACTA	
<i>inIA</i> (internalina C)	238	CECT911	TGTAACCCCGCTTACACAGTT AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	

CECT- Colección Española de Cultivos Tipo; NCTC- National Collection of Type Cultures.

**Anexo (continuação)**

**Tabela A 2.** Informação sobre *breakpoints* de resistência definido por Acciari *et al.*, 2011; CLSI, 2007 e O'Connor *et al.*, 2010.

Classe	Antibiótico	Referências	Diâmetro (mm)			
			Resistente	Intermédio	Susceptível	
Aminoglicósidos	Gentamicina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 12	13-14	≥ 15
β-lactâmicos	Ampicilina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 28	n.a	≥ 29
		Acciari <i>et al.</i> (2011)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 19	n.a	n.a
	Penicilina G	O'Connor <i>et al.</i> (2010)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 13	n.a	n.a
		CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 28	n.a	≥ 29
		Acciari <i>et al.</i> (2011)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 19	n.a	n.a
		O'Connor <i>et al.</i> (2010)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 19	n.a	n.a
Fenicóis	Cloranfenicol	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 12	13-17	≥ 18
Glicopéptidos	Vancomicina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	-	-	≥ 15
		O'Connor <i>et al.</i> (2010)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 12	-	-
Lincosamidas	Clindamicina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 14	15-20	≥ 21
Macrólidos	Eritromicina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 13	14-22	≥ 23
Quinolonas	Ciprofloxacina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 15	16-20	≥ 21
Rifamicina	Rifampicina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 16	17-19	≥ 20
Sulfonamida	Trimetoprim-Sulfametazole	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 10	11-15	≥ 16
Tetraciclina	Tetracilina	CLSI 2007	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 14	15-18	≥ 19
		O'Connor <i>et al.</i> (2010)	<i>Listeria</i> spp.	≤ 14	-	-

## Anexo (continuação)

**Tabela A 3.** Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem na fábrica de queijos e sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica.

Local de amostragem	Alimento/Superfície	Código	Meio	H	G	C	O	I	S
Queijo fresco	-	Ox LAQf 1	Oxford	+	+	+	+		
Queijo fresco	-	Ox LAQf 2	Oxford	+	+	+	+		
Queijo fresco	-	Ox LAQf 3	Oxford	+	+	+	+		
Queijo fresco	-	Ox LAQf 4	Oxford	+	+	+	+		
Puxador da porta II	Zona de maturação	Ox LSPu-II 1	Oxford	-					
Puxador da porta II	Zona de maturação	Ox LSPu-II 2	Oxford	-					
Puxador da porta II	Zona de maturação	Ox LSPu-II 3	Oxford	-					
Puxador da porta II	Zona de maturação	Ox LSPu-II 4	Oxford	-					
Líquido Salmoura	Câmara de cura	Ox LASal 1	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Líquido Salmoura	Câmara de cura	Ox LASal 2	Oxford	-					
Líquido Salmoura	Câmara de cura	Ox LASal 3	Oxford	-					
Líquido Salmoura	Câmara de cura	Ox LASal 4	Oxford	-					
Queijo fresco	-	AL LAQf 1	ALOA	+	+	+	+		
Queijo fresco	-	AL LAQf 2	ALOA	+	+	+	+		
Água não tratada	-	AL LAWnt	ALOA	+	+	+	-	LNM.	
Líquido Salmoura	Câmara de cura	AL LASal 1	ALOA	+	-				
Líquido Salmoura	Câmara de cura	AL LASal 2	ALOA	+	-				
Líquido Salmoura	Câmara de cura	AL LASal 3	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Carrinhos I	Zona de queijo fresco	AL LSCa-I 1	ALOA	+	-				
Carrinhos I	Zona de queijo fresco	AL LSCa-I 2	ALOA	+	-				
Ralo II	Zona de maturação	AL LSRA-II 1	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Ralo II	Zona de maturação	AL LSRA-II 2	ALOA	+	+	+	-		
Ralo II	Zona de maturação	AL LSRA-II 3	ALOA	-					
Ralo II	Zona de maturação	AL LSRA-II 4	ALOA	-					
Luvas dos trabalhadores I	Zona do embalamento	AL LSLu-I 1	ALOA	+	+	+	+		
Luvas dos trabalhadores I	Zona do embalamento	AL LSLu-I 3.1	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Luvas dos trabalhadores I	Zona do embalamento	AL LSLu-I 3.2	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Luvas dos trabalhadores I	Zona do embalamento	AL LSLu-I 3.3	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a

Símbolos: +, teste positivo; -, teste negativo; H – hemólise da esculina; G – gram, O – oxidase; I –

identificação; S – serogrupo; a vermelho, resultado negativo para o género *Listeria*; a verde, isolados

identificados como *Listeria* spp.

## Anexo (continuação)

**Tabela A 4.** Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem no matadouro de suínos e a sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica.

Local de amostragem	Alimento/Superfície	Código	Meio	H	G	C	O	I	S
Chão	Zona de corte	Ox LSMch I 1	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Chão	Zona de corte	Ox LSMch I 2	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Chão	Zona de corte	Ox LSMch I 3	Oxford	-					
Maçaneta	Zona de corte	Ox LSMmac 1	Oxford	+	+	+	-	LM	4b-4e-4ab
Maçaneta	Zona de corte	Ox LSMmac 2	Oxford	+	+	+	-	LNM.	
Maçaneta	Zona de corte	Ox LSMmac 3	Oxford	-					
Caixa de transporte limpa	Zona de corte	Ox LSM tra I 1	Oxford	+	+	+	+		
Caixa de transporte limpa	Zona de corte	Ox LSM tra I 2	Oxford	-					
Caixa de transporte limpa	Zona de corte	Ox LSM tra I 3	Oxford	-					
Caixa de transporte manipulada	Zona de corte	Ox LSM tra II	Oxford	-					
Carcaça Suíno	Zona da cabeça	AL LSMcar I dil.	ALOA	+	+	+	+		
Carcaça Suíno	Zona da cocha	AL LSMcar II	ALOA	+	+	+	-		
Carcaça Suíno Rejeitada	-	AL LSMcar III 1	ALOA	+	+	+	+		
Carcaça Suíno Rejeitada	-	AL LSMcar III 2	ALOA	+	+	+	+		
Chão	Zona de corte	AL LSMch I 1	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Chão	Zona de corte	AL LSMch I 2	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Ralo	Zona de corte	AL LSMral I 1	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Ralo	Zona de corte	AL LSMral I 2	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Ralo	Zona de corte	AL LSMral I 3	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Ralo	Zona de corte	AL LSMral I 4	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Ralo	Zona de corte	AL LSMral I 5	ALOA	-					
Ralo	Zona salsicharia	AL LSMral II 1	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Ralo	Zona salsicharia	AL LSMral II 2	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Ralo	Zona salsicharia	AL LSMral II 3	ALOA	-					
Ralo	Zona de picagem	AL LSMral III 1	ALOA	-					
Ralo	Zona de picagem	AL LSMral III 2	ALOA	-					
Ralo	Zona de picagem	AL LSMral III 3	ALOA	+	+	+	-		
Luvras manipuladas	Zona de corte	AL LSMluv 1	ALOA	+	+	-			
Luvras manipuladas	Zona de corte	AL LSMluv 2	ALOA	+	+	-			
Luvras manipuladas	Zona de corte	AL LSMluv 3	ALOA	+	+	-			
Maçaneta	Zona de corte	AL LSMmac dil. 1	ALOA	+	+	+	+		
Maçaneta	Zona de corte	AL LSMmac dil. 2	ALOA	-					
Maçaneta	Zona de corte	AL LSMmac enr. 1	ALOA	+	+	+	+	LNM	4b-4e-4ab
Maçaneta	Zona de corte	AL LSMmac enr. 2	ALOA	+	+	+	+	LM	
Maçaneta	Zona de corte	AL LSMmac enr. 3	ALOA	+	+	+	+	LNM	
Caixa de transporte limpa	Zona de corte	AL LSMtra I 1	ALOA	+	+	+	+		
Caixa de transporte limpa	Zona de corte	AL LSMtra I 2	ALOA	-					
Caixa de transporte manipulada	Zona de corte	AL LSMtra II 1	ALOA	+	+	+	+		
Caixa de transporte manipulada	Zona de corte	AL LSMtra II 2	ALOA	+	+	+	+		

Símbolos: +, teste positivo; -, teste negativo; H – hemólise da esclulina; G – gram, O – oxidase; I – identificação; S – serogrupo; a vermelho, resultado negativo para o género *Listeria*; a verde, isolados identificados como *Listeria* spp.

## Anexo (continuação)

**Tabela A 5.** Informação sobre a origem dos isolados obtidos após amostragem no hipermercado e a sua identificação por métodos fenotípicos e genotípica.

Local de amostragem	Alimento/Superfície	Código	Meio	H	G	C	O	I	S
Avental	Charcutaria	Ox LSJCav 1	Oxford	-					
Avental	Charcutaria	Ox LSJCav 2	Oxford	-					
Avental	Charcutaria	Ox LSJCav 3	Oxford	-					
Mão	Charcutaria	Ox LSJCM 1	Oxford	+	+	+	-		
Mão	Charcutaria	Ox LSJCM 2	Oxford	+	+	+			
Mão	Charcutaria	Ox LSJCM 3	Oxford	+	-				
Mão	Charcutaria	Ox LSJCM 4	Oxford	+	+	+	-		
Mão	Charcutaria	Ox LSJCM 5	Oxford	-			-		
Luva	Talho	Ox LSJTLuv 1	Oxford	-					
Luva	Talho	Ox LSJTLuv 2	Oxford	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Luva	Talho	Ox LSJTLuv 3	Oxford	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Luva	Talho	Ox LSJTLuv 4	Oxford	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Faca	Talho	Ox LSJTFac 1	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Faca	Talho	Ox LSJTFac 2	Oxford	+	+	+		LNM	
Faca	Talho	Ox LSJTFac 3	Oxford	+	+	+			
Faca	Talho	Ox LSJTFac 4	Oxford	+	+	+			
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc 1	Oxford	-					
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc 2	Oxford	-					
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc 3	Oxford	+	-				
Ralo lava-loiça	Talho	Ox LSJTRI 1	Oxford	+	-				
Ralo lava-loiça	Talho	Ox LSJTRI 2	Oxford	-					
Ralo chão	Talho	Ox LSJTRal 1	Oxford	+	+	+	+	LNM	
Ralo chão	Talho	Ox LSJTRal 2	Oxford	-					
Ralo chão	Talho	Ox LSJTRal 3	Oxford	-					
Ralo chão	Talho	Ox LSJTRal 4	Oxford	-					
Balança	Peixaria	Ox LSJPBal dil.	Oxford	-					
Ralo chão	Peixaria	Ox LSJPRal 1	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Ralo chão	Peixaria	Ox LSJPRal 2	Oxford	+	-		-		
Ralo chão	Peixaria	Ox LSJPRal 3	Oxford	-			-		
Carapau	Peixaria	Ox LAJCP 1	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Carapau	Peixaria	Ox LAJCP 2	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Carapau	Peixaria	Ox LAJCP 3	Oxford	+	+	+	-		
Tabuleiro	Gastronomia	Ox LSJGTab 1	Oxford	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Tabuleiro	Gastronomia	Ox LSJGTab 2	Oxford	+	+	+	-	LNM	
Tabuleiro	Gastronomia	Ox LSJGTab 3	Oxford	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Faca	Talho	Ox LSJTFac* 1	Oxford	-	+	+			
Faca	Talho	Ox LSJTFac* 2	Oxford	-	+	+			
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc* 1	Oxford	+	-				
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc* 2	Oxford	-					
Bancada	Talho	Ox LSJTBanc* 3	Oxford	-					
Ralo lava-loiça	Gastronomia	Ox LSJGRal* 1	Oxford	-					
Ralo lava-loiça	Gastronomia	Ox LSJGRal* 2	Oxford	-					
Ralo lava-loiça	Gastronomia	Ox LSJGRal* 3	Oxford	-					
Ralo lava-loiça	Gastronomia	Ox LSJGRal* 4	Oxford	-					
Avental	Charcutaria	AL LSJCAv 1	ALOA	+	+	+	-	LNM	
Avental	Charcutaria	AL LSJCAv 2	ALOA	+	+	+	+		
Avental	Charcutaria	AL LSJCAv 3	ALOA	+	+	+	-		
Avental	Talho	AL LSJTAv dil. 1	ALOA	+	+	+	-		
Avental	Talho	AL LSJTAv dil. 2	ALOA	+	-				
Avental	Talho	AL LSJTAv dil. 3	ALOA	+	+	+	-	LM	4b-4e-4ab
Avental	Talho	AL LSJTAv dil. 4	ALOA	+	+	+	-		
Faca	Talho	AL LSJTFac 1	ALOA	+	-				
Faca	Talho	AL LSJTFac 2	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a

Ralo chão	Talho	AL LSJTRal 1	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Ralo chão	Talho	AL LSJTRal 2	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Ralo chão	Talho	AL LSJTRal 3	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Ralo chão	Talho	AL LSJTRal 4	ALOA	-					
Ralo chão	Talho	AL LSJTRal 5	ALOA	-					
Carne	Talho	AL LAJCar 1	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Carne	Talho	AL LAJCar 2	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Carne	Talho	AL LAJCar 3	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Carne	Talho	AL LAJCar 4	ALOA	+	+	+	-		
Balança	Peixaria	AL LSJPBal 1	ALOA	-					
Balança	Peixaria	AL LSJPBal 2	ALOA	-					
Carapau	Peixaria	AL LAJCP 1	ALOA	+	-				
Carapau	Peixaria	AL LAJCP 2	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Carapau	Peixaria	AL LAJCP 3	ALOA	+	-				
Mão	Gastronomia	AL LSJGM 1	ALOA	+	+				
Mão	Gastronomia	AL LSJGM 2.1	ALOA	+	+	+	-		
Mão	Gastronomia	AL LSJGM 2.2	ALOA	+	+	+	-		
Mão	Gastronomia	AL LSJGM 3	ALOA	-	+				
Mão	Gastronomia	AL LSJGM 4	ALOA	-	+				
Máquina de fatiar leiteão	Gastronomia	AL LSJGMI 1	ALOA	+	+	+	-		
Máquina de fatiar leiteão	Gastronomia	AL LSJGMI 2	ALOA	+	+	+	-		
Máquina de fatiar leiteão	Gastronomia	AL LSJGMI 3	ALOA	-	+				
Tesoura frango assado	Gastronomia	AL LSJGTc 1	ALOA	+	+	+	-		
Tesoura frango assado	Gastronomia	AL LSJGTc 2	ALOA	+	+	+	-		
Tesoura frango assado	Gastronomia	AL LSJGTc 3	ALOA	-	+				
Tesoura frango assado	Gastronomia	AL LSJGTc 4	ALOA	-	+				
Tabuleiro	Gastronomia	AL LSJGTab 1	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Tabuleiro	Gastronomia	AL LSJGTab 2	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Tabuleiro	Gastronomia	AL LSJGTab 3	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2a-3a
Tabuleiro	Gastronomia	AL LSJGTab 4.1	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2c-3c
Tabuleiro	Gastronomia	AL LSJGTab 4.2	ALOA	+	+	+	-	LM	1/2c-3c
Sandes delícias do mar	Gastronomia	AL LAJSan 1	ALOA	+	+	-			
Sandes delícias do mar	Gastronomia	AL LAJSan 2	ALOA	+	+	-			
Sandes delícias do mar	Gastronomia	AL LAJSan 3	ALOA	+	+	-			
Lombo assado	Gastronomia	AL LAJLom 1	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Lombo assado	Gastronomia	AL LAJLom 2	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 1	ALOA	+	+	+	+		
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 2	ALOA	+	+	+	+		
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 3	ALOA	+	+	+	+		
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 4	ALOA	+	+	+	+		
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 5.1	ALOA	+	+	+			
Máquina de fatiar fimabre	Charcutaria	AL LSJCMf* 5.2	ALOA	+	+	+			
Ralo lava-loiça	Gastronomia	AL LSJGRal* 1	ALOA	+	+	-			
Ralo lava-loiça	Gastronomia	AL LSJGRal* 2	ALOA	+	+	+	-		
Ralo lava-loiça	Gastronomia	AL LSJGRal* 2'	ALOA	+	+	+	-	LNLM	
Ralo lava-loiça	Gastronomia	AL LSJGRal* 3	ALOA	+	+	-			
Ralo lava-loiça	Gastronomia	AL LSJGRal* 4	ALOA	+	+	-			

Símbolos: +, teste positivo; -, teste negativo; \*, após higienização; H – hemólise da esculina; G – gram, O – oxidase; I – identificação; S – serogrupo; a vermelho, resultado negativo para o género *Listeria*; a verde, isolados identificados como *Listeria* spp.