



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**ANÁLISE DO GENE DA INTERNALINA A E CAPACIDADE DE
ADESÃO E INVASÃO CELULAR DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE
INDÚSTRIAS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

MARGARETI MEDEIROS

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA – DF

JUNHO – 2019



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

**ANÁLISE DO GENE DA INTERNALINA A E CAPACIDADE DE
ADESÃO E INVASÃO CELULAR DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE
INDÚSTRIAS E ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL**

MARGARETI MEDEIROS

ORIENTADOR: DR^a. ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA

TESE DE DOUTORADO EM SAÚDE ANIMAL

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: MEDICINA PREVENTIVA E PATOLOGIA VETERINÁRIA
PUBLICAÇÃO: 014/2019**

BRASÍLIA/DF

JUNHO/2019




UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL


MARGARETI MEDEIROS

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA
DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM SAÚDE
ANIMAL

APROVADA POR:


ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Prof. Dr. (UnB)
(ORIENTADOR)


SIMONI PERECMANIS, Prof. Dr. (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)


FERNANDO ARARIPE GONÇALVES TORRES, Prof. Dr. (IB/UnB)
(EXAMINADOR EXTERNO)


CRISTIANO SALES PRADO, Prof. Dr. (UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS-UFG)
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA – DF, 05 DE JULHO DE 2019

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MEDEIROS, M. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019, 47 p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, que foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. A autora reserva para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora. Citações são estimuladas desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ma Medeiros , Margareti
ANÁLISE DO GENE DA INTERNALINA A E CAPACIDADE DE ADESÃO
E INVASÃO CELULAR DE LISTERIA MONOCYTOGENES DE INDÚSTRIAS E
ALIMENTOS DE ORIGEM ANIMAL / Margareti Medeiros ;
orientador Ângela Patrícia Santana . -- Brasília, 2019.
47 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Saúde Animal) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Stop codon . 2. Invasão celular . 3. Caco2. I.
Santana , Ângela Patrícia , orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dr^a Ângela Patrícia Santana pela confiança, paciência e carinho esses anos todos, gratidão.

Agradecimento especial a equipe do laboratório de Microbiologia de Alimentos: Virgílio, Emília, Haiana pela ajuda, solidariedade e carinho.

Aos colegas da Pós graduação em Saúde Animal, em especial a Joana Marchesini Palma e Milena dos Santos, obrigada!

Ao meu marido Vitor Canabarro e minha filha Isabela, amor e gratidão infinita.

À minha família, que mesmo a distância me acompanhou nessa jornada.

À Dr^a Simoni Perecmanis pelo apoio e confiança e por permitir o uso dos equipamentos do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária.

À equipe do laboratório de Microbiologia Médica Veterinária, especialmente à Cleia e Maurício, pela disponibilidade em me ajudarem sempre que precisei.

À Franciele Schelemmer, muito obrigada pela ajuda, compreensão e paciência!

À Dra Elaine Cristina Pereira De Martinis, por ter me recebido na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e contribuído na realização do trabalho.

Agradecimento especial a Marília Ishizawa, técnica de laboratório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e o MSc. Fabian Camilo Niño-Arias pela ajuda técnica, dedicação e carinho.

Ao Dr. Ricardo Titze de Almeida pela confiança em permitir a utilização do laboratório de Terapias Gênicas durante os experimentos.

Aos meus amigos e colegas Eleonora D'Ávila Erbesdobleador, Vanessa da Silva Mustafa, Guilherme Tognoli e Tatiana Marçola, muito obrigada!

Ao Programa de Pós Graduação em Saúde Animal pela oportunidade de cursar o doutorado.

À CAPES e ao Decanato de Pós Graduação pelo auxílio financeiro.

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Noé R. de Medeiros (*in memoriam*) e a minha filha Isabela!

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno alimentar emergente, de distribuição mundial, envolvido em surtos e em casos esporádicos de listeriose, decorrentes principalmente da ingestão de derivados cárneos intensamente manipulados e prontos para o consumo. Este trabalho teve por objetivos realizar a sorotipificação de isolados de *L. monocytogenes* oriundos de diversas fontes do Distrito Federal e Entorno, bem como promover o sequenciamento do gene internalina A e avaliar a capacidade de adesão e invasão dos isolados em Caco-2. Dentre os 25 isolados de *L. monocytogenes* foram detectados 12 isolados do sorotipo 1/2a, sete isolados do sorotipo 4b, três isolados do sorotipo 1/2c e três isolados do sorotipo 1/2b e classificados nas linhagens I, 19 dos isolados e linhagem II, 6 isolados. Verificou-se a presença de mutação na posição 976 bp (GAA → TAA) levando a *stop codons* prematuros em cinco dos 25 isolados de *L. monocytogenes*. Os testes de adesão e invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 demonstram que os isolados foram capazes de aderir e invadir as células, e os isolados que apresentaram os *stop codons* prematuros tiveram maior capacidade de invasão celular quando comparados a capacidade de invasão dos isolados que não apresentaram *stop codons* prematuros. Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que os isolados de *L. monocytogenes* representam um risco potencial para a Saúde Pública, e que são as primeiras descrições de *stop codons* presentes no gene da InlA na região do Distrito Federal e País.

Palavras Chave: Caco-2; *stop codons*; invasão celular

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is an emergent food pathogen, distributed worldwide, which is involved in outbreaks and sporadic cases of listeriosis, mainly arising from the ingestion of intensely handled and ready-to-eat meat-derived products. This work aimed to carry out the serotyping of *L. monocytogenes* isolates originating from various sources in Brazil's Federal District and the surrounding region; to carry out the sequencing of the internalin A gene; and to evaluate the capacity of isolates to adhere to and invade Caco-2 cells. Among the 25 isolates of *L. monocytogenes* were detected 12 isolates of serotype 1/2a, seven isolates of serotype 4b, three isolates of serotype 1/2c and three isolates of serotype 1/2b; of these, 19 were classified in lineage I, and six in lineage II. The presence of a mutation was verified in position 976 bp (GAA → TAA), leading to a premature stop codon in five of the 25 isolates of *L. monocytogenes*. The tests regarding adhesion and invasion of *L. monocytogenes* in Caco-2 cells demonstrated that the isolates were capable of adhering to and invading these cells, and the isolates that presented premature stop codon had a greater capacity for cell invasion than isolates that did not present premature stop codons. The results obtained in this study enabled us to affirm that the *L. monocytogenes* isolates represent a potential risk to public health, and these are the first descriptions of stop codons present in the InlA gene in the Federal District region of Brazil.

Key words: Caco-2; stop codons; cell invasion

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 2

Tabela 1 -	Origem das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isolados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da FAV/ UnB, entre os períodos 2013 e 2018.....	27
Tabela 2 -	Resultados dos testes de sorotipagem de <i>L. monocytogenes</i> isoladas de fontes diversas no laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da FAV/UnB, entre os períodos de 2013 a 2018.....	32
Tabela 3 -	Resultados dos sequenciamentos do gene da InlA em isolados de <i>L. monocytogenes</i> oriundos de amostras diversas, para presença ou ausência de mutações que levam ao <i>stop codons</i> prematuros.....	34
Tabela 4 -	Resultados dos testes de adesão e invasão dos 25 isolados de <i>L. monocytogenes</i> de origens diversas, em células Caco-2 com presença e ausência de <i>stop codons</i> prematuros.....	37

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 2

- Figura 1 -** Alinhamento do gene da internalina do isolado 3 com o isolado EGD-e (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), destacando em amarelo a presença de *stop codon* no isolado número 3 de *L. monocytogenes*..... 36
- Figura 2 -** Análise filogenética do gene internalina A. A árvore foi calculada pelo método máxima verossimilhança baseada no alinhamento de 25 sequências de nucleotídeos parciais do gene InIA. A árvore foi inferida com alinhamento de múltiplas sequências usando MAFFT v.7 e a análise filogenética foi estimada com o programa IQ-TREE com 10.000 réplicas (bootstrap). O melhor modelo de substituições de nucleotídeos (Best-fit model) foi estimado utilizando o ModelFinder com o modelo Kimura (K3Pu+F+I) escolhido de acordo com o BIC (Bayesian Information Criterion). A árvore foi enraizada no ponto médio (midpoint rooted) para clarificação. Ramificações com suporte de bootstrap <70% foram colapsadas..... 37
- Figura 3 -** Variação de adesão de Caco2 dos isolados de *L. monocytogenes*. Valores representam a porcentagem de adesão dos isolados na ausência de *stop codons* prematuros (A) e presença de *stop codons* prematuros (B)..... 39
- Figura 4 -** Variação de invasão de Caco2 dos isolados de *L. monocytogenes*. Valores representam a porcentagem de adesão dos isolados na ausência de *stop codons* prematuros (A) e presença de *stop codons* prematuros (B)..... 40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Caco-2	Células de linhagem de Adenocarcinoma de cólon humano
c-Met	Receptor de fator de crescimento de hepatócitos
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
gC1qR	Receptor de molécula complemento
InIA	Internalina A
InIB	Internalina B
LAMAL	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
FAV/UNB	Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPITULO 1	
I. INTRODUÇÃO	14
II. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
III. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
CAPITULO 2	
I.INTRODUÇÃO.....	24
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
1. Origem das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	26
2. Sorotipagem das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	28
3. Análise do sequenciamento do gene da internalina A.....	28
4. Cultura de células de caco-2.....	29
5. Ensaios de adesão das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	30
6. Ensaios de invasão das cepas de <i>L. monocytogenes</i>	30
7. Análise estatística.....	31
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1. Sorotipagem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i>	32
2. Análise das sequências do gene da Internalina A.....	33
3. Adesão e invasão dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> em células Caco-2...	37
IV. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno alimentar, de distribuição mundial, envolvido em surtos e casos esporádicos de listeriose, decorrentes principalmente da ingestão de alimentos de origem animal intensamente manipulados e prontos para o consumo (FERREIRA et al., 2011; GALARZ et al., 2010; NALÉRIO et al., 2009; SILVA et al., 2004; PELISSER et al., 2001). Os sintomas da doença são semelhantes aos de uma gripe com febre persistente, mal-estar, podendo estar acompanhados de náuseas, vômitos e diarreia (CDC, 2019). Em grupos mais suscetíveis, como crianças, mulheres grávidas, idosos e imunodeprimidos, os sintomas são mais graves como septicemia, meningite, encefalite, aborto ou parto prematuro e morte (CDC, 2019). A infecção acomete preferencialmente as gestantes, com sérias consequências para os fetos (LIU et al., 2007).

Os casos clínicos de infecção por *L. monocytogenes* apresentam alta taxa de letalidade, o que faz com que esta enfermidade seja considerada de grande interesse para a saúde pública (NIGHTINGALE et al., 2005). A análise desse patógeno em alimentos é importante economicamente, uma vez que, em países que adotam medidas extremas de controle e vigilância, há perdas de até US\$ 2,4 bilhões de dólares em casos de *recall* por produtos contaminados, e de US\$ 2,3 bilhões de dólares em custos hospitalares decorrentes de listerioses (ORSI et al., 2011). Estima-se que 1.600 pessoas se infectem a cada ano e cerca de 260 cheguem a óbito (CDC, 2019).

O gênero *Listeria* possui 18 espécies, sendo elas *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *Listeria grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephansis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae* e *L. costaricensis* (CHIARA et al., 2015; ORSI & WIEDMANN, 2016), sendo duas das espécies consideradas patogênicas, *L. monocytogenes*, para o homem e animais e *L. ivanovii*, para animais (LIU, 2006). Porém, já foram relatados alguns casos de listeriose em humanos por *L. ivanovii*, mostrando que essa espécie também pode apresentar caráter oportunista entérico nos seres humanos (GUILLET et al., 2010). *L. monocytogenes* é um bacilo gram positivo, anaeróbio facultativo, não formador de endósporos, que pode crescer a uma atividade de água de 0,90, multiplica-se em pH 4,1 a 9,6 entre 0 e 42°C, com pH ótimo de 7,0, e multiplicar-se lentamente sob temperaturas de refrigeração (MANTILLA et al., 2007).

L. monocytogenes é classificada de acordo com os antígenos somático (O) e flagelar (H), em 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, são considerados responsáveis por mais de 98% dos casos de listeriose em humanos (VÁZQUEZ-BOLAND, 2001). A sorotipagem por PCR pode ser utilizada para classificar os quatro principais sorovares de *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, implicados frequentemente em casos de doença em humanos e associação a alimentos (DOUMITH et al., 2004; DOUMITH, et al., 2005). Sorovares 3a, 3b, 4d, 4 e 7 geralmente não estão associados a casos de humanos (DOUMITH et al., 2004). Estudos filogenéticos separam *L. monocytogenes* em três linhagens genéticas como I, II e III, a primeira (I) com os sorotipos 1/2a, 4b e 3b encontrados normalmente em casos de listeriose humana. A segunda linhagem (II) representada pelos sorotipos 1/2b, 1/2c e 3a no qual são obtidos principalmente em alimentos e um terceiro grupo (III) em que estão presentes os sorotipos 4a e 4c, considerado raros e podem ser encontrados em casos clínicos de listeriose em animais (NORTON et al., 2001; GRAY et al., 2004; FUGETT et al., 2007).

A presença de qualquer espécie de *Listeria* nos alimentos de origem animal é indicativo de condição higiênica deficiente em alguma etapa do processamento industrial, distribuição e ou armazenamento (LACIAR et al., 2006). Além disso, vale ressaltar que a *L. monocytogenes*, por ser encontrado em vários alimentos, pode causar severos quadros clínicos provocados a partir da ingestão de baixa dose infectante (ARRUDA, 2007). Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, cozimento inadequado, armazenamento impróprio, e falta de higiene durante o preparo dos produtos cárneos são condições que podem predispor os indivíduos a se contaminarem e tornarem-se portadores assintomáticos ou doentes (GARRITY et al., 2003).

L. monocytogenes é encontrada numa grande diversidade de alimentos, como carnes de bovinos, de suínos e de aves, leite e derivados, pescados, vegetais, alimentos embutidos e produtos diversos prontos para o consumo e refrigerados (SANTOS et al., 2004). É um dos mais importantes patógenos veiculados por alimentos (SILVA, 2009) e pode ser achado em carnes bovina (principalmente moída), suína e de frango, linguiças, mortadelas, presuntos, salsichas, leite cru (MANTILLA et al., 2007). No ambiente industrial, *L. monocytogenes* pode estar em suspensão ou organizadas na forma de biofilmes, que se fixam às superfícies (CESAR et al., 2011; ANDRADE, 2018). A maior importância da *L. monocytogenes* para a indústria de alimentos talvez seja o fato desta

bactéria poder sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração. Este fator constitui num obstáculo para a maioria dos patógenos. Esse dado é relevante principalmente para os alimentos refrigerados prontos para consumo em caso de serem insuficientemente processados e/ou contaminados após o processamento (MCCARTHY, 1997).

Uma vez instalada nas fábricas de processamento de alimentos de origem animal, a bactéria do gênero *Listeria* dificilmente é eliminada da indústria. Essa característica se deve ao fato da grande capacidade da bactéria em formar biofilme, além do fato de apresentar alta resistência à variação de temperatura, à variação de pH, ao tratamento com salmoura e ao vácuo (FRANCIOSA et al., 2001). Grande parte da contaminação dos alimentos por essas bactérias ocorre após o processamento dos alimentos, quando os produtos já estão prontos para o consumo (SCARCELLI e PIATTI, 2002).

As mudanças nas características e nos hábitos alimentares das populações, a forma de produção dos alimentos, a habilidade da *Listeria* spp. de sobreviver em variadas condições, sua capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, aliado à sua resistência ao congelamento, ao calor e aos diversos antibióticos, transformaram esse microrganismo emergente e de grande relevância entre os patógenos transmitidos por alimentos e atualmente constitui um grande problema para as indústrias de alimentos e órgãos oficiais de regulamentação (MANTILLA et al., 2007). A frequência de *Listeria* spp. encontradas aponta risco significativo para a produção, pois pode indicar uma maior probabilidade de ocorrência de *L. monocytogenes*, tornando-se um fator indicativo de risco à segurança do alimento (CESAR et al., 2011).

L. monocytogenes possui capacidade de aderir, invadir e multiplicar em diferentes tipos celulares, como macrófagos e uma variedade de células não fagocíticas como as células endoteliais, hepatócitos, fibroblastos (PIZARRO-CERDA et al., 2012). Essa capacidade está relacionada a uma variedade de proteínas conhecidas como internalinas (ORTEGA et al., 2017). As principais são as internalinas A (InlA) e a internalina B (InlB) que são proteínas de superfície caracterizadas por repetições ricas em leucina (LRR) (ORSI et al., 2011; CHEN et al., 2009; VAN STELTEN et al., 2010; TSAI et al., 2006).

Estudos indicam que *L. monocytogenes* pode reconhecer receptores diferentes nas células eucarióticas, incluindo glicoproteínas transmembrânicas como a E-caderina, receptor de molécula complemento (gC1qR), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (c-Met), além de componentes da matriz extracelular, como as

proteoglicanas. A proteína InlA apresenta interação específica com a proteína E-caderina presente na superfície de células epiteliais humanas como, por exemplo, Caco-2 (Células de adenocarcinoma de cólon humano). InlB está envolvida na entrada de *L. monocytogenes* em hepatócitos e outras células não-epiteliais. Ao interagir, essas proteínas permitem a invasão da *L. monocytogenes* e sua eventual migração para corrente sanguínea e decorrente bacteremia (TSAI et al., 2006; ORSI et al., 2011). As principais proteínas receptoras do hospedeiro que interagem com InlB são gC1qR (receptor da fração C1q do sistema complemento), e Met (BRAUN et al., 2000; COSSART, 2002; PIZZARRO-CERDA e COSSART, 2006). Outras proteínas de superfície, como as autolisinas (Ami, p60 e Auto) podem estar envolvidas no processo de invasão, porém atuando como adesinas (CABANES et al., 2004).

L. monocytogenes pode perder seu potencial de virulência, ou seja, sua habilidade de invasão celular, devido a mutações no gene da InlA que levam à presença de *stop codons* prematuros levando a uma expressão deformada dessa proteína (CHEN et al., 2011; KYOUI et al., 2014). Cepas de *L. monocytogenes* que produzem uma forma truncada de InlA são consideradas de baixa virulência e com reduzida capacidade de invadir cultivos de células Caco2 (JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005; NIGHTINGALE et al., 2008). Mutações que levam a *stop codons* prematuros têm sido identificadas e a ocorrência dessas mutações tem sido relatadas em diversos países (GELBICOVA, 2015; CRUZ et al., 2016). Alguns estudos demonstram que amostras de *L. monocytogenes* que apresentam *stop codons* representam 35-45% das amostras de alimentos (KYOUI, et al., 2014).

Amostras de *L. monocytogenes* que possuem a InlA truncada podem ser 10.000 vezes menos virulentas que amostras que possuem uma funcional InlA (CHEN et al., 2011). Entretanto, amostras de *L. monocytogenes* que possuem mutações na InlA e sintetizam uma forma truncada da proteína, podem ser causa de listeriose humana (JACQUET et al., 2004; VAN STELTEN et al., 2010, GELBÍČOVÁ et al., 2015). Holch et al., (2013) demonstraram que amostras de *L. monocytogenes* isoladas de plantas de processamento de alimentos que possuíam esse tipo de mutação no gene da InlA, foram capazes de atravessar a barreira placentária depois da exposição oral em camundongos e porquinho da Índia. Quando os testes são realizados *in vitro*, amostras clínicas são menos invasivas que amostras não clínicas quando testadas em célula Caco-2 e células hepáticas HepG2, diferente do que acontece em células THP1 em que não há diferença na

capacidade de invasão pelas diferentes amostras clínicas (ROUSSEAU et al., 2004; WERBROUCK et al., 2006).

Pesquisas demonstram que algumas cepas de *L. monocytogenes* perderam seu potencial de virulência, ou seja, sua habilidade de invasão celular, devido à presença de *stop codons*, levando a uma expressão deformada dessa proteína e ainda que essas mutações se mantêm nas populações bacterianas (CHEN et al., 2011; STELTEN et al., 2010, KYOUI et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar a sequência do gene da internalina A (InlA) em isolados de *L. monocytogenes* oriundas de alimentos de origem animal, comercializados e/ ou produzidos no Distrito Federal, bem como isolados de estabelecimentos produtores de alimentos de origem animal.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Promover a sorotipificação de isolados de *L. monocytogenes* por reação em cadeia da polimerase (PCR);
- 2) Analisar a sequência do gene da internalina A de *L. monocytogenes* de isolados de alimentos e de indústrias produtoras de alimentos de origem animal para a presença de mutações que determinam a presença de *stop codons* prematuros;
- 3) Avaliar a capacidade dos isolados de *L. monocytogenes* em aderir e invadir células Caco2 *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, J. M. *L. monocytogenes* formadoras de biofilmes em presuntos fatiados e sua sensibilidade aos sanitizantes Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Biociência Animal. UFRPE, 2018.
- ARRUDA, G.A. *Listeria* e listeriose: perigo para as gestantes. Ed. Ponto Crítico, 2ª ed., 143p., 2007.
- BRAUN, L., GHEBREHIWET, B., COSSART, P. gC1q-R/p32, a C₁₉-binding protein, is a receptor for the InLB invasion protein of *L. monocytogenes*. **EMBO J** 19: 1458-1466, 2000.
- CABANES D., DUSSURGET O., DEHOUX P., & COSSART P. Auto, a surface associated autolysin of *L. monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. **Molecular Microbiology**, 51(6), 1601–1614, 2004.
- CDC. Center for Disease Control e Prevenção. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>. Acesso em 30 de maio de 2019.
- CESAR, A.P.R., MESQUITA, A. J.; PRADO, C. S.; NUNES, I. A.; ALMEIDA FILHO, E. S. *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* na produção de salsichas tipo Hot Dog. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.2, 339-352, 2011.
- CHEN, Y.; ROSS, W.H.; WHITING, R.C.; STELTEN, A.V.; KIGHTINGALE, K.K.; WIEDMANN M.; SCOTT, V.N. Variation in *L. monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 1171-1180, 2011.
- CHEN, B-Y; KIN, T-J; SILVA, J.L.; JUNG, Y-S. Positive correlation between the expression of *inlA* and *inlB* genes of *L. monocytogenes* and its attachment strength on glass surface. **Food Biophysics**, 4:304-311, 2009.
- CHIARA, M.; CARUSO, M.; D'ERCHIA, A. M.; MANZARI, C.; FRACCALVIERI, R.; GOFFREDO, E.; LATORRE, L.; MICCOLUPO, A.; PADALINO, I.; SANTAGADA, G.; CHIOCCO, D.; PESOLE, G.; HORNER, D. S.; PARISI, A. Comparative genomics of *Listeria* Sensu Lato: Genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. **Genome Biology and Evolution**, 7(8), 2154–2172, 2015.
- COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *L. monocytogenes*: an overview. **International Journal of Medical Microbiology**. 2002, 401-409.
- CRUZ, C.D., PITMAN, A. R., SALLY, A. HARROW, S.A., FLETCHER, C. G. *L. monocytogenes* Associated with New Zealand Seafood Production and Clinical Cases: Unique Sequence Types, Truncated InlA, and Attenuated Invasiveness. **Applied and Environmental Microbiology**. v.80, v.4 p. 1489–1497, 2016.

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

DOUMITH, M.; JACQUET, C.; GERNER-SMIDT, P.; GRAVES, L. M.; LONCAREVIC, S.; MATHISEN, T.; MORVAN, A.; SALCEDO, C.; TORPDAHL, M.; VAZQUEZ, J. A.; MARTIN, P. (2005) Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an international standard. **Journal of Food Protection**, USA, p. 2648-2649, 10 jun.

FERREIRA, V.; BARBOSA, J.; STASIEWICS, M.; VONGKAMJAN, K.; SWITT, A.M.; HOGG, T.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.; WIEDMANN, M. Diverse geno- and phenotypes of persistent *L. monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 8, p. 2701-2715, Apr. 2011.

FRANCIOSA, G.; TARTARO, S.; NEERGAARD, W.; AURELI, P. Characterization of *L. monocytogenes* Strains Involved in Invasive and Noninvasive Listeriosis Outbreaks by PCR-Based Fingerprinting Techniques. **Applied and Environmental Microbiology**. 2001. v.67, n.4, p. 1793-1799.

FUGETT, E.B., SCHOONMAKER-BOPP, D., DUMAS, N.B., CORBY, J. AND WIEDMANN, M. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *L. monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE Types. **J Clin Microbiol** 45:865–873. 2007.

GALARZ, L.A.; FONSECA, G.G.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. Crescimento microbiano em produtos à base de peito de frango durante simulação da cadeia de abastecimento. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 870-877, 2010.

GELBÍČOVÁ T, KOLÁČKOVÁ I, PANTŮČEK R, KARPÍŠKOVÁ R. A novel mutation leading to a premature *stop codons* in *inlA* of *L. monocytogenes* isolated from neonatal listeriosis. **New Microbiology**. v. 38, p.293–296, 2015.

GRAY, M. J., R. N.; ZADOKS, R. N.; FORTES, E. D.; DOGAN, B.; CAI, S.; YUHUAN CHEN, Y.; SCOTT, V. N.; GOMBAS, D. E.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. *L. monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Appl. Environ. Microbiol.** 70:5833-5841, 2004.

GUILLET, C.; JOIN-LAMBERT, O.; LE MONNIER, A.; LECLERCQ, A.; MECHAÏ, F.; MAMZER-BRUNEEL, M. F.; BIELECKA, M. K.; SCORTTI, M.; DISSON, O.; BERCHE, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J.; LORTHOLARY, O.; LECUIT, M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerg Infect Dis.** 16:136-8, 2010.

HOLCH, A. Genome sequencing identifies two nearly unchanged strains of persistent *L. monocytogenes* isolated at two different fish processing plants sampled 6 years apart. **Appl. Environ. Microbiol.** 79, 2944–2951, 2013.

JACQUET, C.; DOUMITH, M.; GORDON, J. I.; MARTIN, P. M. V.; COSSART, P.; LECUIT M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *L. monocytogenes*. **J. Infect. Dis.** 189: 2094–2100, 2004.

KYOU, D., TAKAHASHI, H., MIYA, S., KUDA, T., KIMURA, B. Comparison of the major virulence-related genes of *L. monocytogenes* in Internalin A truncated strain 36-25-1 and a clinical wild-type strain. **BMC Microbiology**, 14:15, 2014.

LACIAR, L.; VACA, R.; LOPRESTI, A. DNA Fingerprinting by ERIC-PCR for Comparing *Listeria spp.* Strains Isolated from Different Sources in San Luis, Argentina. **Revista Argentina de Microbiologia**. v.38, p.55-60, 2006.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *L. monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.645-659, 2006.

LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AUSTIN, F.W.; AINSWORTH, A.J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *L. monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, 7:133-140, 2007.

MCCARTHY, S.A. Incidence and survival of *L. monocytogenes* in ready-to-eat seafood products. **J. Food. Prot.** v. 60, n. 4, p. 372-376, 1997.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.; GOUVÊA, R. Importância da *L. monocytogenes* em Alimentos de Origem Animal. **Revista da FZVA**. v.14, n.1, p.180-192, 2007.

NALÉRIO, E.S.; ARAÚJO, M.R.; MENDONÇA, K.S.; BASSANI, M.T.; SILVA, W.P. *L. monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 626-630, jul.-set., 2009.

NIGHTINGALE, K.K.; WINDHAN, K.; MARTIN, K.E.; YEUNG, M.; WIEDMANN, M. Select *L. monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8764-8772. 2005.

NIGHTINGALE, K.K., IVY, R.A., HO, A.J., FORTES, E.D., NJAA, B.L., PETERS, R.M., WIEDMANN, M. InlA premature stop codons are common among *L. monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. **Appl. Environ. Microbiol.** 74, 6570–6583. 2008

NORTON, D. M., J. M. SCARLETT, K. HORTON, D. SUE, J. THIMOTHE, K. J. BOOR, AND M. WIEDMANN. Characterization and pathogenic potential of *L. monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:646-653, 2001.

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

ORSI, R.H.; RIPOLI, D.R.; YEUNG, M.; NIGHTINGALE, K.K.; WIEDMANN, M. Recombination and positive selection contribute to evolution of *L. monocytogenes inlA*. **Microbiology**, 153, p. 2666-2678, 2007.

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

ORTEGA, F.; RENGARAJAN, M.; CHAVEZ, N.; RADHAKRISHNAN, P.; GLOERICH, M.; BIANCHINI, J.; SIEMERS, K.; LUCKETT, W. S.; LAUER, P.; JAMES NELSON, W.; THERIOT, J. A. Adhesion to the host cell surface is sufficient to mediate *L. monocytogenes* entry into epithelial cells. **Molecular Biology of the Cell**, USA, p. 2945-2957, 1 nov. 2017.

PELISSER, M.R.; MENDES, S.D.C.; SUTHERLAND, A.D.; BATISTA, C.R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, 32:113-116, 2001.

PIZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**. 124:715–27, 2006.

PIZARRO-CERDA, J.; KUHbacher, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. **Cold Spring Harb Perspect Med**, USA, p. 1-17, 5 jul. 2012.

ROUSSEAU, M.O.; LEMAITRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-Restriction Fragment length polymorphism on *inlA* for rapid screening of *L. monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2180-2185, apr. 2004.

SANTOS, L.A.G.; SANTOS L. A. G.; TEODORO V. A. M.; MONTEIRO L. L.; GUIMARÃES K. R.; PINTO P. S. A.; BEVILACQUA P. D. Listeriose transmissível por produtos de origem animal. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 124, p. 35-42, 2004.

SCARCELLI, E.; PIATTI, R.M. Patógenos Emergentes Relacionados à Contaminação de Alimentos de Origem Animal. *Instituto Biológico*. v.64, n.2, p.123-127, 2002.

SILVA, W.P.; LIMA, A.S.; GANDRA, E.A.; ARAÚJO, M.R.; MACEDO, M.R.P., DUVAL, E.H. *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p.911-916, 2004.

TSAI, Y-H.L.; ORSI, R.H.; NIGHTINGALE, K.K.; WIEDMANN, M. *L. monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p.378-389, 2006.

VAN STELTEN, A.; SIMPSON, J. M.; WARD, T. J.; NIGHTINGALE, K. K. Revelation by Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping That Mutations Leading to a Premature Stop Codon in *inlA* Are Common among *L. monocytogenes* Isolates from Ready-To-Eat Foods but Not Human Listeriosis Cases. **American Society for Microbiology**, USA, p. 2783-2790, 22 fev. 2010.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 584–640, 2001.

WERBROUCK, H.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; PAMEL, E. V.; RIJPENS, N.; DAMME, J. V.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; COILLIE, E. V. Differential *inlA* and *inlB* Expression and Interaction with Human Intestinal and Liver Cells by *L. monocytogenes* Strains of Different Origins. **Applied and environmental microbiology**. p.3862–3871, 2006.

CAPÍTULO 2

Análise do gene de internalina A e capacidade de adesão e invasão celular de isolados de *Listeria monocytogenes* isoladas de indústrias e alimentos de origem animal

I. INTRODUÇÃO

L. monocytogenes é um patógeno alimentar emergente, de distribuição mundial, envolvido em casos graves de doença gastrointestinal, septicemia, meningite meningocéfalite, além de infecções perinatais e abortos, decorrentes principalmente da ingestão de derivados cárneos e produtos lácteos, intensamente manipulados e prontos para o consumo (FERREIRA et al., 2011; GALARZ et al., 2010; NALÉRIO et al., 2009; SILVA et al., 2004; PELISSER et al., 2001). Em grupos mais suscetíveis, como crianças, grávidas, idosos e imunodeprimidos, os sintomas são mais graves, como septicemia, meningite, encefalite, aborto e morte (LIU et al., 2007; SCHWAB e EDELWEISS, 2003).

A bactéria é um bacilo gram positivo pertencente ao gênero *Listeria*, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos e que apresentam motilidade característica (ROCOURT e BUCHRIESER, 2007). O gênero *Listeria* é composto por 18 espécies, sendo a *L. monocytogenes* considerada como agente de doença em humanos e animais (CHIARA et al., 2015; ORSI & WIEDMANN, 2016). Treze sorotipos têm sido descritos baseados em antígenos de superfície, sendo os sorotipos 4b, 1/2b e 1/2a responsáveis por mais de 95% dos casos de listeriose em humanos (GRAVES et al., 1999). A identificação dos diferentes sorotipos se torna importante para ações de controle e estudos epidemiológicos, principalmente quando se trata de contaminações alimentares (DOUMITH, 2004). A identificação dos sorotipos é comumente realizada utilizando-se Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE), no entanto, trata-se de uma técnica laborosa e, por este motivo, não tem sido aplicada em investigações de surtos (GRAVES e SWAMINATHAN, 2001). Técnicas usando multiplex PCR tem sido mais utilizada para classificar *L. monocytogenes* e para triagem rápida de isolados e identificação de sorovares durante surtos de listeriose (DOUMITH, 2005).

A capacidade da bactéria de cruzar as barreiras intestinais, cerebrais e placentária determina os quadros clínicos sendo capaz de invadir e sobreviver em uma ampla variedade de células não fagocíticas (COSART, 2002). Um dos fatores relacionados à essa característica da *L. monocytogenes* é a presença de proteínas denominadas

internalinas, principalmente aos tipos A (InIA) e B (InIB), que permitem o microrganismo invadir células teciduais inespecíficas (ORSI, et al., 2011, CHEN et al., 2010; VAN STELTEN et al., 2010; CHEN et al., 2009; TSAI et al., 2006). Estudos indicam que *L. monocytogenes* pode reconhecer receptores diferentes nas células eucarióticas, incluindo glicoproteínas transmembrânicas como a E-caderina, receptor de molécula complemento (gC1qR), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (c-Met), além de componentes da matriz extracelular, como as proteoglicanas. A proteína InIA apresenta interação específica com a proteína E-caderina presente na superfície de células intestinais epiteliais humanas (GAILLARD, et al., 1987; ORTEGA, et al., 2017).

A capacidade das listerias em causar doença depende da colonização das células do intestino e disseminação para os órgãos (BAKARDJEIV et al., 2004). A habilidade de invasão celular e virulência de listerias estão relacionadas a mutações no gene das internalinas que resultam na presença de *stop codons*, levando a uma expressão deformada dessa proteína (CHEN et al., 2011; STELTEN et al., 2010, KYOUI, et al., 2014), produzindo fenótipos com atenuada virulência e diminuição na eficiência de invadir células epiteliais do intestino (WARD et al., 2010; OLIER et al., 2003; JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005; VAN STELTEN e NIGHTINGALE, 2008). A ocorrência de *L. monocytogenes* que apresentam mutações e uma forma truncada da internalina A tem sido relatada em diferentes regiões o mundo, como EUA (NIGHTINGALE et al., 2005; ORSI et al., 2007; SHEN et al., 2013), Canada (KOVACEVIC et al., 2013), França (OLIER et al., 2003; JACQUET et al., 2004; ROUSSEAU et al., 2004), Portugal (FELICIO et al., 2007) e Japão (HANDA-MIYA et al., 2007). Dezoito tipos de mutações que levam à presença de prematuros stop codon (PMSCs) têm sido descritos no gene *inIA* (VAN STELTEN et al., 2010). No Brasil, há poucos estudos sobre esse patógeno alimentar (LEMES-MARQUES et al., 2007) no que se refere à sua prevalência ou ocorrência, especificamente na região do Distrito Federal e Centro-Oeste, e nenhum no país com relação ao estudo da internalina A (GELBÍČOVÁ, 2015; CRUZ et al., 2016). Trabalhos realizados nos Estados Unidos demonstram que amostras de *L. monocytogenes* que apresentam *stop codons* representam 35-45% das amostras de alimentos (KYOUI et al., 2014).

Levando-se em consideração o exposto e que no Brasil existem poucos estudos a respeito da biologia da *L. monocytogenes* em relação à epidemiologia molecular e verificação de fatores de virulência do microrganismo, este trabalho teve por objetivos

promover a sorotipagem por Reação em Cadeia de Polimerase, análise filogenética das cepas isoladas, análise do gene da *inlA* e caracterizar a eficiência de invasão e/ ou adesão celular de cepas de *L. monocytogenes* oriundas de alimentos e indústrias de origem animal do Distrito Federal e Entorno.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Origem das cepas de *L. monocytogenes*

Foram utilizadas neste estudo um total de vinte e cinco (n=25) cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes fontes, tais como cortes comerciais de carne bovina, amostras de salsicha tipo hot dog, amostras de carcaças de frangos resfriados, 01 amostra de carne mecanicamente separada de aves (sendo todos os produtos obtidos de estabelecimentos comerciais diversos), e também cepas isoladas de *swabs* de ralo de indústria de abatedouro frigorífico de aves. O período de isolamento das cepas compreendeu entre os anos de 2013 e 2018, e foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB) (Tabela 1).

Tabela 1 – Origem das cepas de *L. monocytogenes* isolados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da FAV/ UnB, entre os períodos 2013 e 2018.

Identificação da Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	Origem/ fonte de isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i>	Ano de isolamento
9	Carnes bovinas	2013
26	Carnes bovinas	2013
1	Carnes bovinas	2014
2	Carnes bovinas	2014
3	Carnes bovinas	2014
4	Carnes bovinas	2015
5	Carnes bovinas	2015
6	Carnes bovinas	2015
7	Carnes bovinas	2015
10	Carnes bovinas	2015
17	Salsicha tipo hot dog	2017
19	Salsicha tipo hot dog	2017
20	Salsicha tipo hot dog	2018
23	Salsicha tipo hot dog	2018
18	Carçaça de Frango resfriado	2013
21	Carçaça de Frango resfriado	2013
22	Carçaça de Frango resfriado	2013
24	Carçaça de Frango resfriado	2014
36	Carçaça de Frango resfriado	2014
37	Carçaça de Frango resfriado	2014
27	Carne mecanicamente separada de aves	2016
13	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	2013
16	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	2014
25	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	2014
38	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	2018
Total: 25 cepas		

As metodologias de cultivo e isolamento utilizadas foram as preconizadas pela Instrução Normativa n. 40 de 2005, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2005) para a pesquisa e isolamento microbiológico de *L. monocytogenes*, bem como descrita por Andrade et al., (2014). O controle positivo utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pela Fundação Osvaldo Cruz, localizado no Rio de Janeiro. Para a confirmação da presença de *L. monocytogenes* por PCR foram utilizados o protocolo descrito por Kérouanton et al., (2010), os quais foram utilizados para PCR multiplex os primers para os genes *prfA* (primers - LIP1 e LPI2a) e *prs* (primers - PRS1 e PRS2). As reações da PCR foram realizadas para um volume final de 50µl, contendo 0,4µM de cada primer (marca®), 200 µM de dNTPs (Invitrogene®), 0,2mM de MgCl₂ (Invitrogene®) e 2,5U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) em 1X de solução

tampão (Invitrogene®). O ciclo da PCR foi realizado em aparelho de termociclador (MyCycler thermal cycler – Bio-rad®) e foi composto por: 01 ciclo de desnaturação de 3min a 94°C, seguidos de 30 ciclos de amplificação por 45s de anelamento à temperatura de 53°C, 1min 15s de alongação a 72°C e 40s de desnaturação a 94°C, seguido de 01 ciclo de extensão final de 72°C durante 7min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), em aparelho de transiluminador (Imagequant – Gelifesciences) e os produtos da PCR esperados eram, respectivamente, de tamanho 370 bp, para o gene *prs* e 274bp para o gene *prfA*.

2. Sorotipagem das cepas de *L. monocytogenes*

As cepas de *L. monocytogenes* foram sorotipadas utilizando-se a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito por Doumith et al. (2004) e pela análise do sequenciamento do gene da internalina A. As amplificações de fragmentos específicos, segundo Doumith et al. (2004), permitem a separação das cepas nos grupos I, II, III e IV, os quais no grupo I compreendem as cepas de sorovares 1/2a e 3a (através da amplificação apenas do fragmento de DNA lmo0737, com tamanho de 691bp); o grupo II compreendem as cepas dos sorotipos 1/2c e 3c (com a amplificação de ambos os fragmentos de DNA do lmo0737 e lmo1118, com tamanhos de 691bp e 906bp, respectivamente), e o grupo III os quais compreendem cepas de sorovares 1/2b, 3b e 7 (amplificação de apenas um fragmento de DNA de ORF2819, com tamanho de 471bp), e grupo IV os quais compreendem as cepas compostas de sorovares 4b, 4d e 4e (amplificação de ambos os fragmentos de DNA ORF2819 e ORF2110, com tamanhos de 471bp e 597bp, respectivamente). A confirmação da sorotipagem foi realizada através do sequenciamento em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystem®) do gene da internalina A, nas regiões localizadas entre os nucleotídeos 192bp e 1349bp, com a utilização dos pares de primers O1F e O2R (POYART et al., 1996) e 1472bp a 2232bp, com os primers O3F e O4R (POYART et al., 1996). As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o programa BLAST.

3. Análise da sequência do gene da internalina (*inlA*)

Para a análise da sequência do gene da Internalina A (2400pb) e detecção de presença de *stop codons* foram utilizadas as metodologias descritas por Poyart et al., (1996). A partir das cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram realizadas PCR para

amplificação das regiões localizadas entre os nucleotídeos 192bp e 1349bp e 1472bp a 2232bp, do gene da Internalina A (*inIA*) (POYART et al., 1996). Os primers O1 (5'-GAATGTAACAGACACG-3') e O2 (5'-ATCGCTAATAGTAGC-3') para amplificação de um fragmento de DNA de tamanho 1157bp, e os primers O3 (5'-AGCCACTTAAGGCAAT-3') e O4 (5'-AGTTGATGTGTTAGA-3') para amplificar um fragmento de tamanho de 760 bp. As condições para a realização da PCR, para um volume final de 50µl, foram: 0,5µM de cada primer do fabricante Eurofins Genomics®, 200 µM de dNTPs (Invitrogen®) e 2,5U de Platinum™ Taq DNA polimerase high fidelity (Invitrogen®) em concentração final de 1X da solução tampão da enzima. O ciclo da PCR composto por 1 ciclo com 5 min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 1minuto a 55°C, 90 segundos a 72°C e um minuto à 94°C. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio (0,5µg/ml), em aparelho de transiluminador (Imagequant – Gelifesciences). Os fragmentos amplificados do gene *inIA* foram purificados utilizando o kit Pure link– Invitrogen®) e quantificadas através do marcador High mass – Invitrogen® e, posteriormente sequenciadas em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystem®).

4. Cultura de células Caco2

As células epiteliais da linhagem Caco2 (Adenocarcinoma de cólon humano) utilizadas neste estudo foram cedidas gentilmente pela profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, e são oriundas da coleção de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Para o cultivo das mesmas, seguiu-se o protocolo descrito por Winkelströter e Martinis (2015) em que as células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagles's Medium – High Glicose (DMEM) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® -EUA), penicilina (100U/ml) e estreptomicina (100U/ml) ambos da Sigma-Aldrich® e mantidas em temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ - Q316C) por 24 horas e apresentarem crescimento semi-confluente. Em seguida, as células foram tripsinizadas (Tripsina - Sigma-Aldrich®), e ajustadas às concentrações de 2.5 x 10⁵ células por ml em meio de cultivo DMEM (Sigma-Aldrich®). Em seguida, foi transferido individualmente uma alíquota de 1 ml deste mesmo meio de cultivo celular, para cada poço de placa de polipropileno de 24 poços (Kasvi®). Posteriormente essas placas foram incubadas mantidas em temperatura de 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ (Quimis®) por

24 horas. As células aderidas nas placas foram utilizadas para os ensaios de adesão e invasão de *L. monocytogenes*.

5. Ensaios de adesão das cepas de *L. monocytogenes*

Os ensaios de adesão celular foram realizados conforme descrito por Moroni et al., (2006). As cepas de *L. monocytogenes* foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Broth Heart Infusion - Difco®) e posteriormente incubadas por 24 horas a 37°C em estufas bacteriológicas (Quimis®). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas desta suspensão em solução tampão fosfato salino (PBS) 1x estéril, e plaqueadas em caldo de infusão de cérebro e coração BHI (Difco®), contendo 1,5% de ágar bacteriológico (Acumedia®) e o resultado expresso em UFC/ml. As placas de polipropileno (Kasvi®) contendo as células Caco-2 aderidas aos poços foram lavadas três vezes com a solução de tampão PBS 1X, e cada poço foi infectado com 100µl de suspensões bacterianas contendo 1x10⁷ UFC/ml. Em seguida, foi adicionado a cada poço o volume de 300µl de meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagles's Medium – High Glicose (DMEM) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® -EUA), sem a adição de antibióticos. Após essa etapa, as placas foram incubadas em estufa de câmara de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ - Q316C) por 2 horas a 37°C. Após a incubação essas placas foram lavadas três vezes com solução tampão PBS 1x para a remoção das bactérias não aderidas. Em seguida, foram tratadas com solução de lise celular, contendo 0,1% TRITONx100 (Sigma-Aldrich®) em solução PBS 1x, por 10 minutos a 37°C. O total de células bacterianas viáveis foi verificado através da quantificação por semeadura de diluições decimais seriadas em placas de BHI (Difco®), acrescidos de 1,5% de Ágar Bacteriológico - Acumedia®, do produto obtido do lisado celular e o resultado expresso em UFC/ml. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de adesão de *L. monocytogenes* às células Caco2 foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ adesão} = \text{número de células aderidas} \times 100 / \text{número de células aderidas ao poço}$$

6. Ensaio de invasão de *L. monocytogenes*

Os ensaios de invasão celular foram realizados conforme descrito por Moroni et al., (2006). As cepas de *L. monocytogenes* foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (Broth Heart Infusion - Difco®) e posteriormente incubadas por 24

horas a 37°C em estufas bacteriológicas (Quimis®). Em seguida foram realizadas diluições seriadas desta suspensão em solução tampão fosfato salino (PBS) 1x estéril, e plaqueadas em caldo de infusão de cérebro e coração BHI (Difco®), contendo 1,5% de ágar bacteriológico (Acumedia®) e o resultado expresso em UFC/ml. As placas de polipropileno (Kasvi®) contendo as células Caco-2 aderidas aos poços foram lavadas três vezes com a solução de tampão PBS 1x, e cada poço foi infectado com 100µl de suspensões bacterianas contendo 1×10^7 UFC/ml. Em seguida foi adicionado a cada poço o volume de 300µl de meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagles's Medium – High Glicose (DMEM) (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco® -EUA), sem adição de antibióticos. Após essa etapa as placas foram incubadas em estufa de câmara de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ - Q316C) por 2 horas a 37°C. Após a incubação essas placas foram lavadas três vezes com solução tampão PBS 1x para a remoção das células bacterianas não aderidas. Em seguida as placas foram incubadas em 250µl de solução contendo água miliQ estéril adicionado de 1mg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich®), por uma hora a 37°C em estufa de câmara de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ - Q316C). Após a incubação as placas foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato salino (PBS) 1X esterilizado, e posteriormente as células foram tratadas com 250µl solução de lise celular composto de 0,1% TRITON x-100 (Sigma-Aldrich®) diluído em tampão PBS 1X, e a seguir, incubadas por 10 minutos a 37°C em estufa de câmara de CO₂ (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO₂ - Q316C). O total de células bacterianas viáveis foi verificado através da quantificação por semeadura de diluições decimais seriadas em placas de BHI (Difco® acrescidos de 1,5% de Agar Bacteriológico - Acumedia®), do produto obtido do lisado celular e o resultado expresso em UFC/ml. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de invasão de *L. monocytogenes* às células Caco2 foi calculada pela fórmula:

% adesão= número de células internalizadas recuperadas x 100/número de células aderidas ao poço

7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa STATA 12® (STATA CORP, 2011). Foi realizada a estatística descritiva das taxas médias de Adesão e Invasão alcançadas pelos isolados de *L. monocytogenes*, na presença e ausência de *stop*

codons prematuros. Para comparação entre os valores médios alcançados entre os dois grupos analisados, isolados com e sem *stop códon* prematuro, sendo essas variáveis inicialmente testadas quanto à normalidade pelo teste Shapiro-Wilk. Diante de dados não paramétricos, o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*

Dos sorotipos encontrados nos 25 isolados de *L. monocytogenes* deste estudo foram identificados que dos 10 isolados de *L. monocytogenes* oriundas de carne bovina cinco (05) foram do sorotipo 4b, três (03) do sorotipo 1/2c e dois (02) do sorotipo 1/2a. Nos 04 isolados de *L. monocytogenes* oriundas de salsichas tipo hot dog foram detectados dois (02) sorotipos 1/2a e dois (02) sorotipos 4c. Nos isolados de oriundos de carcaça de frango foram identificados dois (02) sorotipos 1/2b e quatro (04) 1/2a; na carne mecanicamente separada foi encontrado o sorotipo 1/2b; e nos isolados oriundos de ralos dos ambientes das indústrias de abatedouros frigoríficos foi verificado apenas o sorotipo 1/2a. Os resultados contendo as amostras as quais as bactérias foram isoladas com seus respectivos sorotipos identificados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados dos testes de sorotipagem de *L. monocytogenes* isoladas de fontes diversas no laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da FAV/UnB, entre os períodos de 2013 a 2018.

Número de isolados de <i>L. monocytogenes</i>	Origem/ fonte do isolamento de <i>L. monocytogenes</i>	Sorotipo	Classificação da linhagem
5	Carnes bovinas	4b	I
2	Carnes bovinas	1/2 ^a	I
3	Carnes bovinas	1/2 c	II
2	Salsichas tipo hot dog	4b	I
2	Salsichas tipo hot dog	1/2 a	I
2	Carcaças de Frango resfriado	1/2b	II
4	Carcaças de Frango resfriado	1/2 ^a	I
1	Carne mecanicamente separada de aves	1/2b	II
4	Swabs de ralo de piso abatedouro frigorifico de aves	1/2 ^a	I
Total: 25 cepas			

Os resultados demonstram que o sorotipo 1/2a foi o mais detectado, sendo 12 no total de 25 isolados deste estudo, perfazendo 48%, e foi encontrado nas diferentes origens analisadas tais como as amostras de carnes bovina (02 isolados), nas amostras de salsichas tipo hot dog (02 isolados), nas amostras de carcaças de frango resfriados (04 isolados) e nas amostras de *swabs* de ralos de piso de indústria abatedouro frigorifico de aves (04

isolados). O sorotipo 4b foi o segundo mais detectado sendo 7 do total de 25 representando 28% dos isolados analisados, sendo 05 isolados oriundos de amostras de carnes bovinas e 02 isolados de salsichas tipo hot dog. O sorotipo 1/2c foi detectado em percentagem de 12% (03 isolados) e somente nas amostras oriundas de carnes bovinas. O sorotipo 1/2b foi caracterizado em carcaças de frango resfriado e carne mecanicamente processada, representando 12% (03 isolados) dos isolados.

São descritos na literatura científica 13 tipos de sorotipos de *L. monocytogenes* (NORTON et al., 2001; GRAY et al., 2004; FUGETT et al., 2007), e os sorotipos encontrados neste estudo 1/2a, 1/2b e 4b têm sido relacionados a mais de 90% dos casos e surtos de listeriose segundo Jawetz et al., (1998) e Cabrita et al., (2004). Segundo Lianou et al., (2006) os sorotipos 1/2a e 1/2b estão mais envolvidos em casos esporádicos de listeriose, enquanto que o sorotipo 4b é o mais associado a surtos em humanos. O sorotipo 1/2c encontrado neste estudo, detectado em três amostras de carnes bovinas, são descritos em menor frequência na literatura e foram associadas a alimentos de origem animal (LAMBERTZ et al., 2013, VALLIM et al., 2015; PALMA et al., 2016) e ambientes de indústrias de alimentos de origem animal (NALÉRIO et al., 2009; CAMARGO et al., 2013; LAMBERTZ et al., 2013). Em relação às linhagens genéticas descritas por Norton et al., (2001), Gray et al., (2004) e Fugett et al., (2007) os sorotipos 1/2a e 4b detectados neste estudo encontram-se inseridas na linhagem I, que é frequentemente descrita nos casos de listeriose humana (HOFER et al., 2006; LEME-MARQUES et al. 2007). Os sorotipos 1/2a e 1/2c encontrados neste estudo em carnes bovina, carcaças resfriadas de frango e salsichas tipo hot dog, corroboram com as frequentes descrições na literatura de isolamento deste sorotipo de alimentos, e que os classificam na linhagem II (DOUMITH et al., 2004).

A PCR associada ao sequenciamento mostrou-se efetivos na sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes* deste estudo, e permitiram detectar sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b isolados de alimentos e de ambientes de indústrias de alimentos, e corroboram com os achados de Doumith et al., (2004) e Doumith et al., (2005) em que a técnica permitiu detecção de diferentes sorotipos em alimentos.

Os sorotipos 1/2a (12/25), 4b (7/25), 1/2b (3/25) e 1/2c (3/25) encontrados neste estudo foram relatadas por Kramarenko et al., (2013) em que detectaram o mesmo sorotipo em diferentes tipos de alimentos de origem animal na Estônia e por Wu et al., (2015), na China, quando analisados alimentos de origem animal prontos para consumo.

Os mesmos relatos quanto sorotipagem são descritos por Doumith et al., (2004) na Índia e em Montevideo – Uruguai quando analisaram alimentos de origem animal congelados vendidos no varejo (BRAGA et al., 2017).

A identificação dos sorotipos 1/2a, 4b, 1/2b e 1/2c, neste estudo corroboram com resultados encontrados no Brasil, por Hofer et al., (2006) em que detectaram os mesmos sorotipos nos mesmos tipos de alimentos (carnes bovinas, salsichas Tipo Hot Dog, carcaças de frango e carne mecanicamente processada de aves). Vallim et al., (2015) detectaram os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b, em amostras de alimentos de diferentes estados do Brasil exceto pelo sorotipo 1/2c que não foi identificado. Estudos de sorotipagem, por PCR, feito por Figueiredo (2015) em Salvador, Bahia, em amostras de presunto suíno e peito de peru demonstraram somente a presença de sorotipo 1/2a nas amostras. Os sorotipos 4b, 1/2a e 1/2c foram também encontrados no Distrito Federal por Palma et al., (2016) em amostras de cortes cárneos bovinos, e ralos dos ambientes da indústria frigorífica.

2. Análise das sequências do gene da internalina A

Os resultados da análise de sequências do gene da InlA (2400bp) dos isolados de *L. monocytogenes*, bem como a presença ou ausência de mutações que levam a *stop codonss* prematuros estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados dos sequenciamentos do gene da InlA em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras diversas, para presença ou ausência de mutações que levam ao *stop codons* prematuro.

Identificação da Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	Origem/ fonte de isolamento de <i>L. monocytogenes</i>	Presença ou ausência de <i>stop codons</i>	Posição do <i>stop codons</i> no gene da internalina
3	Carnes bovinas	Presença	976bp
26	Carnes bovinas	Presença	976 bp
10	Carnes bovinas	Presença	976 bp
36	Carcaça de Frango resfriado	Presença	976 bp
27	Carne mecanicamente separada de aves	Presença	976 bp
2	Carnes bovinas	Ausência	-
9	Carnes bovinas	Ausência	-
4	Carnes bovinas	Ausência	-
5	Carnes bovinas	Ausência	-
6	Carnes bovinas	Ausência	-
7	Carnes bovinas	Ausência	-
1	Carnes bovinas	Ausência	-
17	Salsicha tipo hot dog	Ausência	-
19	Salsicha tipo hot dog	Ausência	-
20	Salsicha tipo hot dog	Ausência	-
23	Salsicha tipo hot dog	Ausência	-
18	Carcaça de Frango resfriado	Ausência	-
21	Carcaça de Frango resfriado	Ausência	-
22	Carcaça de Frango resfriado	Ausência	-
24	Carcaça de Frango resfriado	Ausência	-
37	Carcaça de Frango resfriado	Ausência	-
13	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorífico de aves	Ausência	-
16	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorífico de aves	Ausência	-
25	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorífico de aves	Ausência	-
38	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorífico de aves	Ausência	-
Total: 25 cepas			

A análise por sequenciamento do gene da InlA (2.400pb) revelou a presença de *stop codons* prematuro na posição 976 bp (GAA → TAA) (Figura 1) em cinco (05) dos 25 isolados de *L. monocytogenes*, perfazendo um total de 20%. Foi detectado a presença de *stop codons* em três isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras de carnes bovina, sendo dois isolados do sorotipo 1/2c e um isolado do sorotipo 1/2b. Foi detectado a presença de *stop codons* em um isolado de carcaça de frango, sorotipo 1/2b. Foi detectado também a presença de *stop codons*, em um isolado oriundo de carne mecanicamente separada de aves do sorotipo 1/2b.

```

      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
L. monoc. EGD-e  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Espécime 3.    CACATTGGCGAGTTTAAACAAACCTTACAGATTAGATTAGCAAATAACCAAATTAGTAATCTAGCACCACCTGTCGGGCTAACAAACTAACTGAGTTA
      910      920      930      940      950      960      970      980      990
1000
L. monoc. EGD-e  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Espécime 3.    AAAC TTGGAGCTAACCAAATAAGTAACATCAGTCCCTTAGCAGGTTAACCGCACTCACTAACTTAGAGCTTAATGAAAATCAGTGGAGATATTAGCC
      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090
1100
L. monoc. EGD-e  .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Espécime 3.    CAA-TTCTAACCTGAAAAATCTCACATATTTAAC TTTG TACTTTAATAATATAAGTGATATAAGCCAGTTCTAGTTAACAAAGCTTCAAAGATTAT
      1100     1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190
Espécime 3.    CAA-TTCTAACCTGAAAAATCTCACATATTTAAC TTTG TACTTTAATAATATAAGTGATATAAGCCAGTTCTAGTTAACAAAGCTTCAAAGATTAT

```

Figura 1: Alinhamento do gene da internalina do isolado 3 com o isolado EGD-e (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), destacando em amarelo a presenças de *stop codons* no isolado número 3 de *L. monocytogenes*.

Os cinco isolados de *L. monocytogenes* deste estudo apresentaram *stop codons* prematuro na posição do nucleotídeo 976pb do gene da internalina A. Estes resultados são idênticos ao descrito por Gelbíčová et al., (2015) que detectaram a presença de *stop codons* nesta mesma posição, em um isolado de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2c, de amostra clínica de doença em humano na República Tcheca. Análises das sequências da InlA em diferentes isolados de *L. monocytogenes* relatam que a presença de PMSCs em posições próximas à identificada nesse estudo, e que por sua vez não interferiram na capacidade de infecção das células, ou resultaram em cepas com capacidade reduzida de infecção (NIGHTIGALE et al., 2005; CHEN et al., 2011). Mutações que levam a presença de *stop codons* prematuro no gene da InlA são descritos em isolados de alimentos e raramente em isolados clínicos (VAN STELTEN et al., 2010). Quando analisadas amostras de isolados clínicos 96% apresentaram uma internalina completa contra 65% das amostras de isolados de alimentos (JACQUET et al., 2004). A presença de *stop codons* em regiões próximas a identificada neste estudo (976bp) já foram descritas anteriormente entre cepas isoladas de amostras de enfermidades clínicas em humanos e de isolados de alimentos em outros países (NIGHTIGALE et al., 2005; FELICIO et al., 2007; RAGON et al., 2008; VAN STELTEN et al., 2010; CANTINELLI et al., 2013; KOVACEVIC et al., 2013), no entanto não há nenhum estudo que descreva a presença de *stop codons* prematuro neste gene da InlA no Brasil, sendo este o primeiro relato no país e na região. Ainda é possível afirmar a partir dos resultados obtidos neste estudo que estes isolados apresentam potencial risco patogênico em relação à posição do *stop codons* prematuros observados.

A análise filogenética das sequências da internalina A e dos sorotipos detectados neste estudo através do programa Geneous versão 7.1.5 (Figura 2) possibilitou o agrupamento dos isolados que apresentaram *stop codons* prematuros. Isso demonstra similaridades entre os isolados 3, 10, 26, 27 e 36 demonstrando uma possível origem em comum.

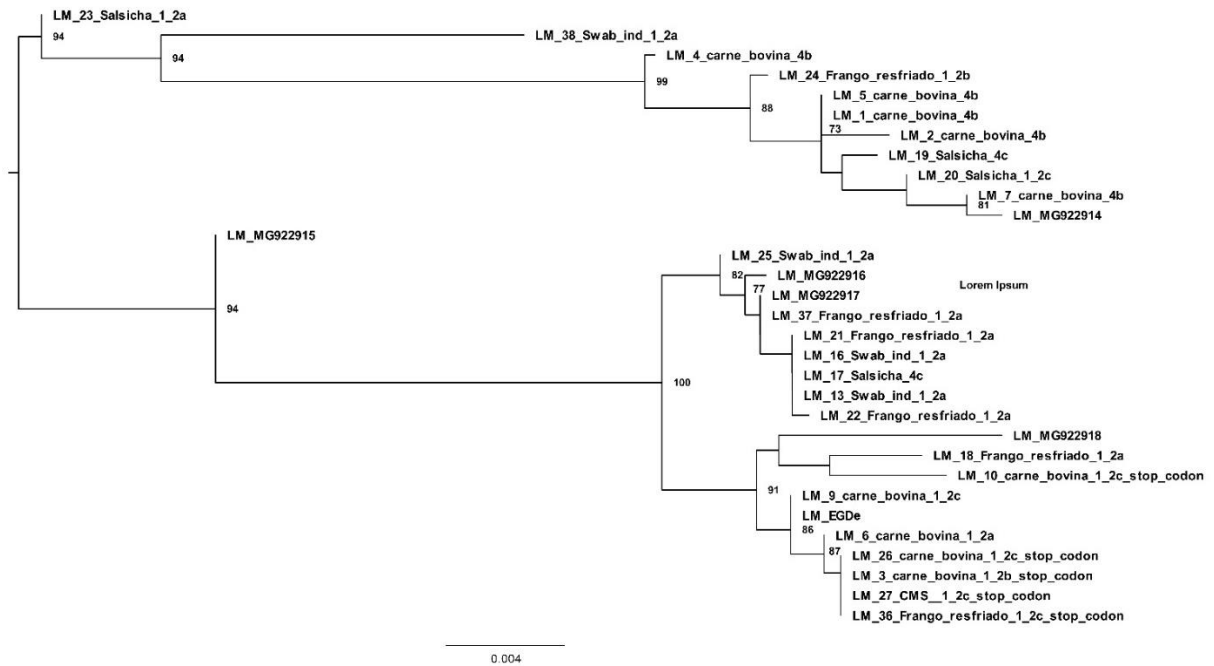


Figura 2 - Análise filogenética do gene internalina A. A árvore foi calculada pelo método máxima verossimilhança baseada no alinhamento de 25 sequências de nucleotídeos parciais do gene *InlA*. A árvore foi inferida com alinhamento de múltiplas sequências usando MAFFT v.7 e a análise filogenética foi estimada com o programa IQ-TREE com 10.000 réplicas (bootstrap). O melhor modelo de substituições de nucleotídeos (Best-fit model) foi estimado utilizando o ModelFinder com o modelo Kimura (K3Pu+F+I) escolhido de acordo com o BIC (Bayesian Information Criterion). A árvore foi enraizada no ponto médio (midpoint rooted) para clarificação. Ramificações com suporte de bootstrap <70% foram colapsadas.

3. Adesão e invasão dos isolados de *L. monocytogenes* em células Caco-2

Os resultados dos testes de adesão e invasão dos 25 isolados de *L. monocytogenes* em células Caco-2, tanto das cinco amostras dos isolados com o *stop codons* prematuros como das ausentes estão representados individualmente na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados dos testes de adesão e invasão dos 25 isolados de *L. monocytogenes* de origens diversas, em células Caco-2 com presença e ausência de *stop codons* prematuros.

Amostra	Origem	Presença/ausência <i>stop codons</i> prematuros	% Adesão	% Invasão
3	Carnes bovinas	<i>stop codons</i> (posição 976pb)	42,80	21,10
10	Carnes bovinas	<i>stop codons</i> (posição 976pb)	67,70	48
26	Carnes bovinas	<i>stop codons</i> (posição 976pb)	70,20	24,50
27	CMS	<i>stop codons</i> (posição 976pb)	70,13	54,15
36	Carçaça de Frango resfriado	<i>stop codons</i> (posição 976pb)	65,50	42,00
1	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	70,50	15,50
2	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	73,70	40,80
4	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	47,60	7,60
5	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	50,50	23,20
6	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	40,10	15,00
7	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	65,00	27,60
9	Carnes bovinas	Ausência de <i>stop codons</i>	58,50	31,50
13	Swab de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	Ausência de <i>stop codons</i>	56,00	22,50
16	Swab de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves.	Ausência de <i>stop codons</i>	32,80	18,40
17	Salsicha tipo hot dog	Ausência de <i>stop codons</i>	36,20	13,02
18	Carçaça de Frango resfriado	Ausência de <i>stop codons</i>	53,70	8,00
19	Salsicha tipo hot dog	Ausência de <i>stop codons</i>	32,20	24,20
20	Salsicha tipo hot dog	Ausência de <i>stop codons</i>	38,40	26,40
21	Carçaça de Frango resfriado	Ausência de <i>stop codons</i>	46,50	20,50
22	Carçaça de Frango resfriado	Ausência de <i>stop codons</i>	45,5	22,3
23	Salsicha tipo hot dog	Ausência de <i>stop codons</i>	54,50	13,50
24	Carçaça de Frango resfriado	Ausência de <i>stop codons</i>	49,80	39,20
25	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	Ausência de <i>stop codons</i>	59,20	42,60
37	Carçaça de Frango resfriado	Ausência de <i>stop codons</i>	46,5	21,2
38	Swabs de ralo de piso de abatedouro frigorifico de aves	Ausência de <i>stop codons</i>	36,20	40

Todos os 25 isolados foram capazes de aderir e invadir as células Caco-2 com porcentagem de adesão variando entre 32,8% e 73,7% e porcentagem de invasão de 7,6% e 54,15%. Os cinco isolados que apresentaram a presença de *stop codons* prematuros tiveram porcentagem de adesão variando entre 42,8% e 70,2% e de invasão entre 21,1% e 54,15%.

Os isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram *stop codons* prematuros tiveram a capacidade de aderir e invadir células Caco-2. A presença de *stop codons* na posição 976pb detectada nos isolados deste estudo não inviabilizaram a adesão e invasão das bactérias de diferentes origens, o que corrobora com os resultados encontrados de presença de *stop codons* prematuros por JACQUET et al., (2004), em que verificaram na posição do nucleotídeo 565, substituição de C→T, e Van Stelten e Nightingale, (2008) que encontraram na posição do nucleotídeo 229 a substituição de C→T, e na posição do nucleotídeo 508 a substituição de G→T. Já Van Stelten et al., (2010) encontraram na posição do nucleotídeo 758 substituição de T→A, e essas substituições não impediram a invasão e adesão de cepas de *L. monocytogenes* em cultivo de células Caco-2.

Os resultados dos testes de adesão e invasão foram submetidos aos testes de Kruskal-Wallis para averiguação de existência ou não de diferença entre os isolados com e sem *stop codons*. Analisando a taxa de adesão, não foi possível confirmar com 95% de confiança que há uma diferença de taxa média de adesão entre os grupos estudados. Já na análise da taxa de invasão o teste permite confirmar com 95% de confiança, que os isolados que apresentam *stop códons* prematuros apresentaram uma taxa média de invasão superior àqueles sem *stop codons*. Os dois grupos, com e sem *stop codons* foram capazes de aderir e invadir as células de cultivo Caco-2. As figuras 3 e 4 demonstram a variabilidade estatística dos isolados de *L. monocytogenes* em relação a capacidade de adesão e invasão celular com e sem a presença de *stop codons* prematuros.

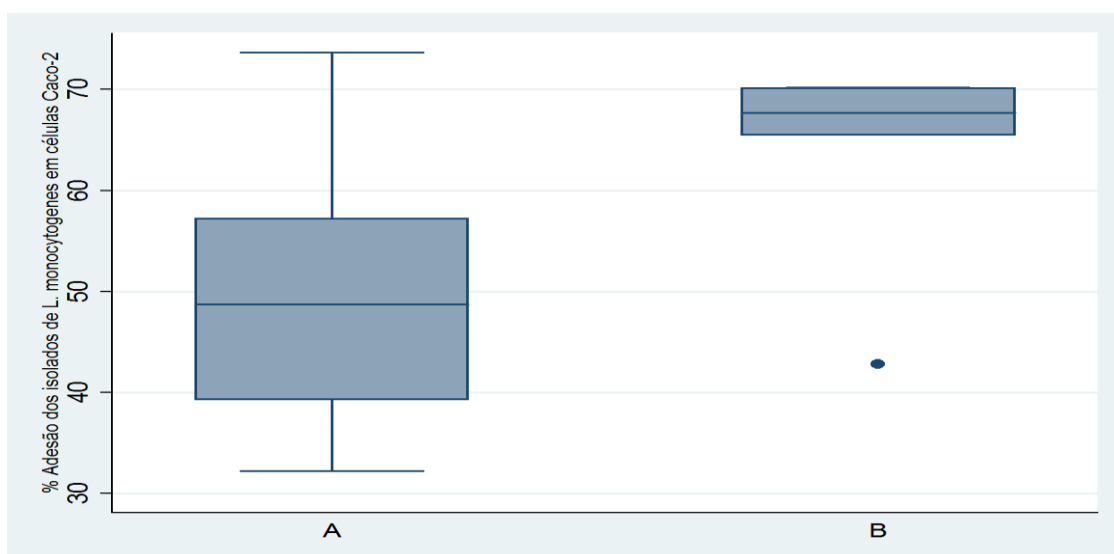


Figura 3: Variação de adesão de Caco2 dos isolados de *L. monocytogenes*. Valores representam a porcentagem de adesão dos isolados na ausência de *stop codons* prematuros (A) e presença de *stop codons* prematuros (B).

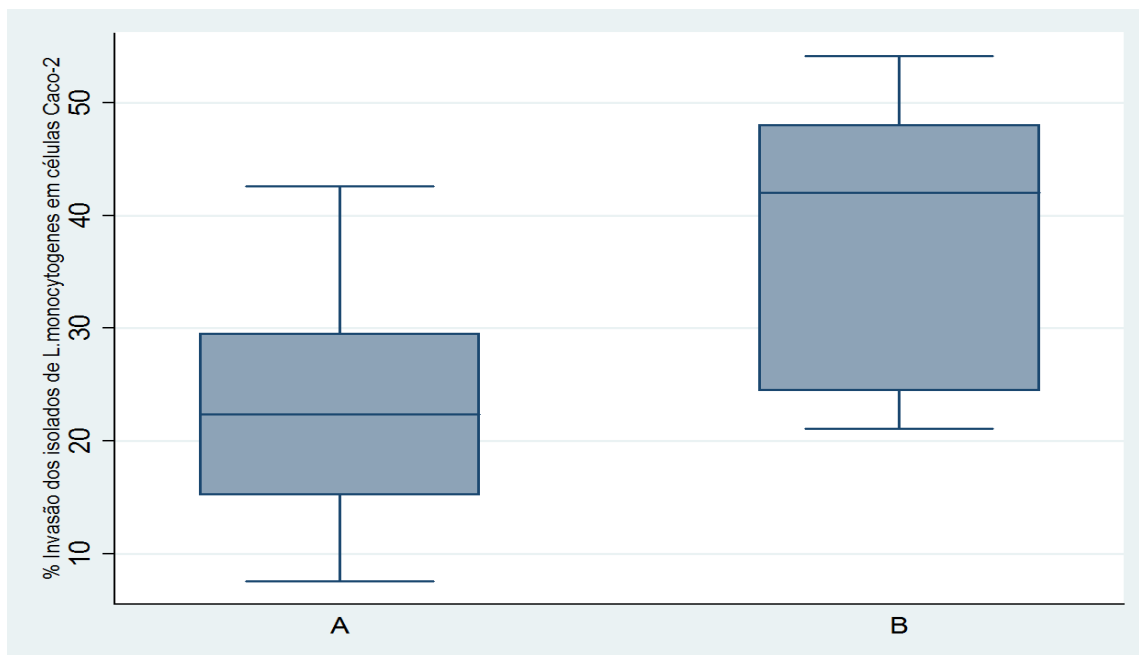


Figura 4: Variação de invasão de Caco2 dos isolados de *L. monocytogenes*. Valores representam a porcentagem de invasão dos isolados na ausência de *stop codons* prematuros (A) e presença de *stop codons* prematuros (B).

Os resultados das análises estatísticas demonstraram que os isolados analisados apresentam variação na capacidade de adesão e invasão de células Caco-2, mas a variação não é estatisticamente significativa quando analisamos a capacidade de adesão dos isolados com e sem *stop codons*. A análise estatística de capacidade de invasão dos isolados de *L. monocytogenes* em células Caco-2 demonstrou que os isolados com *stop codons* possuem capacidade de invasão significativamente maior em relação aos que não possuem *stop codons*. Esses resultados, no entanto, não nos permitem afirmar que *L. monocytogenes* apresentando *stop codons* nessa posição (976pb) possuem capacidade de invasão maior em relação a cepas que não apresentam mutação nessa posição, em virtude dessa característica ter sido encontrada em apenas cinco dos isolados analisados. Em relação a capacidade de invasão Winkelstro e De Martinis (2013), Silva et al., (2017) e Xie et al., (2018) destacam que outros mecanismos além da InlA, podem estar envolvidos na capacidade de adesão e invasão, Segundo Schubert Heinz (2003) as duas principais proteínas envolvidas na entrada de *L. monocytogenes* em células, são a InlA e InlB, no entanto outras proteínas como a Listeriolisina O e ActA podem ter papel importante na adesão e internalização dessas bactérias (PIZARRO-CERDA et al., 2012; RADOSHEVICH e COSSART, 2017). Estudos com um maior número de isolados de *Listeria monocytogenes* precisam ser realizados para verificar se há uma interferência

positiva da presença de *stop codons* prematuros na capacidade de invasão em células Caco-2, ainda avaliar a possibilidade de outros mecanismos de adesão e invasão de *L. monocytogenes*. Os resultados de adesão e invasão celular de isolados *L. monocytogenes* obtidos neste estudo permitem afirmar que elas representam um risco potencial para a Saúde Pública, e que são as primeiras descrições de *stop codons* presentes no gene da InlA na região do Distrito Federal e País.

IV. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu verificar a presença dos sorotipos 1/2a, 4b, 1/2c e 1/2b de isolados de *L. monocytogenes* de diferentes fontes, tais como cortes comerciais de carne bovina, amostras de salsicha tipo hot dog, amostras de carcaças de frangos resfriados, amostra de carne mecanicamente separada de aves, e também cepas isoladas de *swabs* de ambiente de indústria de abatedouro frigorífico de aves. O sequenciamento do gene da inlA dos isolados demonstrou a presença de *stop codons* prematuros que foi verificado em cinco isolados de *L. monocytogenes*. Os testes de adesão e invasão em Caco-2 demonstraram que todos os isolados apresentaram capacidade de adesão e invasão celular. Na capacidade de adesão não houve diferença quando comparados entre si os isolados com e sem *stop codons* prematuros. Nos isolados que apresentaram *stop codons* prematuros a capacidade de invasão foi significativamente maior em relação aos isolados que não apresentaram a mutação. Os resultados destacam o risco potencial de *L. monocytogenes* a Saúde Pública e podem servir como base de estudos futuros para avaliar outros fatores envolvidos na virulência de *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade, R. R.; Silva, P. H. C.; Souza, N. R.; Murata, L. S.; Gonçalves, V. S. P.; Santana, A. P. (2014) Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal. *Ciência Rural*, Brasília - DF, p. 147-152, 7 jan.
- Bakardjiev A.I.; Stacy B.A.; Fisher S.J.; Portnoy D.A. (2004) Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission. *Infect Immun.*, 72:489–497.
- Braga, V.; Vázquez S.; Vico, V.; Pastorino, V.; Mota, M. I.; Legnani, M.; Schelotto, F.; Lancibidad, G.; Varela, G. (2017) Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of Microbiology*, Montevideo - URU, p. 689-694, 3 jun.
- Cabrita, P., Correia, S., Ferreira-Dias, S., Brito, L. (2004) Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *System. Applied Microbiol.*, 27:454-461.
- Camargo, A. C. (2013) Caracterização Fenotípica e Molecular de Isolados de *Listeria Monocytogenes* Obtidos em uma Planta de Processamento de Carne Bovina. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, p. 8-85, 12 jun.
- Chen Y.; Ross, W.H.; Whiting, R.C.; Stelten, A.V.; Kightingale, K.K.; Wiedmann M.; Scott, V.N. (2011) Variation in *Listeria monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 4, p. 1171-1180, Feb.
- Chen, B-Y; Kin, T-J; Silva, J.L.; Jung, Y-S. (2009) Positive correlation between the expression of *inlA* and *inlB* genes of *Listeria monocytogenes* and its attachment strength on glass surface. *Food Biophysics*, 4:304-311.
- Chiara, M.; Caruso M.; D'Erchia A.M.; Manzari, C.; Fracalvieri, R.; Goffredo, E.; Latorre, L.; Miccolupo, A.; Padalino, I.; Santagada, G.; Chiocco, D.; Pesole, G.; Horner, D. S.; Parisi, A. (2015) Comparative genomics of *Listeria* Sensus Lato: Genus-wide differences in evolutionary dynamics and the progressive gain of complex, potentially pathogenicity-related traits through lateral gene transfer. *Genome Biology and Evolution*, 7(8), 2154–2172.
- Cossart, P. (2002) Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *International Journal of Medical Microbiology*, 401-409.
- Cruz, C.D., Pitman, A. R., Sally A. Harrow, S.A., Fletcher C. G. (2016) *Listeria monocytogenes* associated with New Zealand seafood production and clinical cases: Unique sequence types, truncated InlA, and attenuated invasiveness. *Applied and Environmental Microbiology*, v.80, v.4 p. 1489–1497.
- Doumith, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Jacquet, C.; Martin, P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.42, n.8, p.3819-3822.

Doumith, M.; Jacquet, C.; Gerner-Smidt, P.; Graves, L. M.; Loncarevic, S.; Mathisen, T.; Morvan, A.; Salcedo, C.; Torpdahl, M.; Vazquez, J. A.; Martin, P. (2005) Multicenter validation of a multiplex PCR assay for differentiating the major *Listeria monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b: Toward an international standard. *Journal of Food Protection, USA*, p. 2648-2649, 10 jun.

Felício, M. T. S.; Hogg, T.; Gibbs, P.; Teixeira, P.; Wiedmann, M. (2007) Recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* contamination in Alheiras represents considerable diversity, including virulence-attenuated isolates. *American Society for Microbiology, USA*, p. 3887-3894, 13 jun.

Ferreira, V.; Barbosa, J.; Stasiewics, M.; Vongkamjan, K.; Switt, A.M.; Hogg, T.; Gibbs, P.; Teixeira, P.; Wiedmann, M. (2011) Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 8, p. 2701-2715, Apr.

Fugett, E.B., Schoonmaker-Bopp, D., Dumas, N.B., Corby, J. and Wiedmann, M. (2007) Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) analysis of temporally matched *listeria monocytogenes* isolates from human clinical cases, foods, ruminant farms, and urban and natural environments reveals source-associated as well as widely distributed PFGE Types. *J Clin Microbiol* 45,865–873.

Gaillard, J. L.; Berche, P.; Mounier, J.; Richard S.; Sansonetti, P. (1987) In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *American Society for Microbiology, USA*, p. 2822-2829, 5 jun.

Galarz, L.A.; Fonseca, G.G.; Prentice-Hernández, C. (2010) Crescimento microbiano em produtos à base de peito de frango durante simulação da cadeia de abastecimento. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v. 30, n. 4, p. 870-877, out.-dez.

Gelbíčová T, Koláčková I, Pantůček R, Karpíšková R. (2015) A novel mutation leading to a premature stop codons in inlA of *Listeria monocytogenes* isolated from neonatal=09876543211listeriosis. *New Microbiology*. v. 38, p.293–296.

Graves, L. M., B. Swaminathan, And S. B. Hunter. (1999) Subtyping *Listeria monocytogenes*, p. 251–297. In E. T. Ryser and E. H. Marth (ed.), *Listeria, listeriosis and food safety*. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Graves, L. M., B. Swaminathan. (2001) PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 65:55–62.

Gray, M. J., R. N. Zadoks, E. D. Fortes, B. Dogan, S. Cai, Y. Chen, V. N. Scott, D. E. Gombas, K. J. Boor, And M. Wiedmann. (2004) *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5833-5841.

- Handa-Miya S., Kimura B., Takahashi H., Sato M., Ishikawa T., Igarashi K., Fujii T. (2007) Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. *Int. J. Food. Microbiol.* 117, 312-318.
- Hofer, E.; Dos Reis, C. M. F.; Hofer, C. B. H. (2006) Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Rio de Janeiro - RJ*, p. 32-37, 24 jan.
- Jawetz, E.; Melnick, J.L.; Adelberg, E.A. (1998) *Microbiologia médica. 20.ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524 p.
- Kerouanton, 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. v.80, n.2, p. 134-137.*
- Kovacevic, J.; Arguedas-Villa, C.; Wozniak, A.; TasarA, T.; Allen, K. J. (2013) Examination of food chain-derived *Listeria monocytogenes* strains of different serotypes reveals considerable diversity in *inlA* genotypes, mutability, and adaptation to cold temperatures. *Journals ASM.org, USA*, p. 1915-1922.
- Kyoui, D., Takahashi, H., Miya, S., Kuda, T., Kimura, B. (2014) Comparison of the major virulence-related genes of *Listeria monocytogenes* in Internalin A truncated strain 36-25-1 and a clinical wild-type strain. *BMC Microbiology, 14:15.*
- Lambertz S.T., Ivarsson S., Lopez-Valladares G., Sidstedt M. & Lindqvist R. (2013) Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from retail ready-to-eat foods, processing plants and listeriosis patients in Sweden. *Int. J. Food Microbiol. 166:186-192.*
- Lemes-Marques, E.G.; Cruz, C.D.; Destro, M.T. (2007) Pheno and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology, 38:287-292.*
- Lianou, A.; Stopforth, J.D.; Yoon, Y.; Wiedmann, M.; Sofos, J. N. (2006) Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection, USA*, p. 2640-2647.
- Liu, D. (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol., v.55, p.645-659.*
- 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, 7:133-140.*
- Moroni, O.; Kheadr, E.; Boutin, Y.; Lacroix, C.; Fliss, I. (2006) Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. *American Society for Microbiology, USA*, p. 6894-6901.

Nalério, E.S.; Araújo, M.R.; Mendonça, K.S.; Bassani, M.T.; Silva, W.P. (2009) *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 29, n. 3, p. 626-630.

Nightingale, K.K.; Windhan, 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 and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8764-8772.

Norton, D. M., J. M. Scarlett, K. Horton, D. Sue, J. Thimothe, K. J. Boor, And M. Wiedmann. (2001) Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:646-653.

Orsi, R.H., Den Bakker H.C., Wiedmann, M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology* 301 p. 79–96.

Orsi, R.H.; Ripoli, D.R.; Yeung, M.; Nightingale, K.K.; Wiedmann, M. (2007) Recombination and positive selection contribute to evolution of *Listeria monocytogenes inlA*. *Microbiology*, 153, p. 2666-2678.

Ortega, F.; Rengarajana, M.; Chavezb, N.; Radhakrishnanc, P.; Gloerichb, M.; Bianchinib, J.; Siemersb, K.; Luckettd, W. S.; Lauere, P.; James Nelson, W.; Theriot, J. A. (2017) Adhesion to the host cell surface is sufficient to mediate *Listeria monocytogenes* entry into epithelial cells. *Molecular Biology of the Cell, USA*, p. 2945-2957.

Palma, J. M.; Lisboa, R. C.; Rodrigues, D. P.; Santos, A. F. M; Hofer, E.; Santana, A. P. (2016) Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal. *Pesq. Vet. Bras., Brasília - DF*, p. 957-964.

Pelisser, M.R., Mendes, S.D.C., Sutherland, A.D., Batista, C.R.V. (2001) Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:113-116.

Pizarro-Cerda, J., Kuhbacher, A., Cossart, P. (2012) Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. *Cold Spring Harb Perspect Med, USA*, p. 1-17.

Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Berche, P. (1996) The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 142, 173–180.

Radoshevich, L. and Cossart, P. (2017) *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Springer Nature, USA*, p. 1-15.

Ragon, M.; Wirth, T.; Hollandt, F.; Lavenir, R.; Lecuit, M.; Le Monnier, A.; Brisse, S. (2008) A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. *PLoS Pathogens, USA*, p. 1-14.

Roberts, A.; Williams, S. K.; Wiedmann, M.; Nightingale, K. K. (2005) Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Journal of Medical Microbiology, USA*, p. 685-693.

Rocourt, J. and Buchrieser, C. (2007) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis e Food safety*. CRC Press, Nova Iorque, 1-12.

Rousseaux, M.O., Lemaitre, J.P., Piveteau, P., Guzzo, J. (2004) Use of PCR-restriction fragment length polymorphism on *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 2180-2185.

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

STATA CORP. Stata: Release 12. Statistical Software. College Station, TX: StataCorp LP. 2011.

Silva, W.P.; Lima, A.S.; Gandra, E.A.; Araújo, M.R.; Macedo, M.R.P., Duval, E.H. (2004) *Listeria* spp. no processamento de linguiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 34, n. 3, p.911-916.

Silva, M. F.; Ferreira, S.; Magalhães, R.; Almeida, G.; Alves, A.; Teixeira, P. (2017) Detection of premature stop codons leading to truncated internalin A among food and clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *Elsevier Ltd., Porto - Portugal*, p. 6-11, 30 mar.

Shen J., Rump L., Zhang Y., Chen Y., Wang X., Meng J. (2013) Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiol.* 35, 58-64.

Tsai, Y-H.L., Orsi, R.H., Nightingale, K.K., Wiedmann, M. (2006) *Listeria monocytogenes* internalins are highly diverse and evolved by recombination and positive selection. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 6, p.378-389.

Vallim, D. C.; Hofer, C. B.; Lisbôa, R. C.; Barbosa, A. V.; Rusak, L. A.; Reis, C. M. F.; Hofer, E. (2015) Twenty years of listeria in Brazil: Occurrence of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serovars in food samples in Brazil between 1990 and 2012. *Hindawi Publishing Corporation, USA*, p. 1-8, 14 jul.

Van Stelten, A.; Simpson, J. M.; Ward, T. J.; Nightingale, K. K. (2010) Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codons in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* Isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *American Society for Microbiology, USA*, p. 2783-2790, 22 fev.

Van Stelten, A., Nightingale, K. (2008) Development and implementation of a multiplex single-nucleotide polymorphism genotyping assay for detection of virulence-attenuating mutations in the *Listeria monocytogenes* virulence-associated gene *inlA*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 7365–7375

Ward T. J., Usgaard T., Evans, P. E. A (2010) Targeted multilocus genotyping assay for lineage, serogroup, and epidemic clone typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 6680–6684.

Winkelstroter, L. K.; De Martinis, E.C.P. (2013) Effect of bacteriocins and conditions that mimic food and digestive tract on biofilm formation, in vitro invasion of eukaryotic cells and internalin gene expression by *Listeria monocytogenes*. *Springer Science+Business*, New York - USA, p. 153-164.

Winkelstroter, L. K.; De Martinis, E.C.P. (2015) Different methods to quantify *Listeria monocytogenes* biofilms cells showed different profile in their viability. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 1, 231-235.

Wu, S.; Wu, Q.; Zhang, J.; Chen, M.; Yan, Z.; Hu, H. (2015) *Listeria monocytogenes* prevalence and characteristics in retail raw foods in China. *PLOS One, USA*, p. 1-16, 28 aug.

Xie, M.; Ding, C.; Guo, L.; Chen, G.; Zeng, H.; Liu, Q. (2018) Evaluation of Caco-2 cells response to *Listeria monocytogenes* virulence factors by RT-PCR. *Elsevier ltd., USA*, p. 79-84, 28 apr.