



Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos
Campus Rio de Janeiro

Cristhiane Moura Falavina dos Reis

AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS AUTOMATIZADAS VITEK 2[®] E MALDI-TOF/MS NA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS ATÍPICAS DE *LISTERIA spp.* ISOLADAS DE ALIMENTOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.

Rio de Janeiro
2020

Cristhiane Moura Falavina dos Reis

AVALIAÇÃO DAS METODOLOGIAS AUTOMATIZADAS VITEK 2® E MALDI-TOF/MS NA IDENTIFICAÇÃO DE CEPAS ATÍPICAS DE *LISTERIA spp.* ISOLADAS DE ALIMENTOS EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.

Dissertação apresentada ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadores: Prof. DSc. Leonardo Emanuel de Oliveira Costa

Profa. DSc. Deyse Christina Vallim da Silva

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por iluminar, sempre, meus caminhos.

Aos meus pais, pelo carinho, oportunidade e incentivo aos estudos.

A minha família e amigos, que compreenderam a minha ausência nos muitos momentos durante a conclusão do mestrado. A minha mãe Eliane pela revisão cuidadosa e pelas sugestões nesse trabalho.

Ao Doutor Ernesto Hofer, uma real definição de mestre. A ele agradeço meus primeiros passos na microbiologia, “todo” meu conhecimento e respeito às bactérias. Obrigada por toda experiência e convivência no Laboratório de Zoonoses Bacterianas.

A minha orientadora externa, Doutora Deyse Christina Vallim da Silva, por todo o apoio, carinho, dedicação, ensinamento e amizade. Obrigada pela confiança, por compreender incondicionalmente toda minha correria e, principalmente a oportunidade de estar de volta ao meu laboratório de origem. Ao meu orientador Doutor Leonardo Emanuel de Oliveira Costa agradeço por acreditar e confiar no meu trabalho.

As amigas e companheiras de bancada, Adriana Marques Frazão, Joyce Modesto de Andrade e Luciana Veloso da Costa por todo apoio, incentivo, carinho e compreensão. Obrigada por TUDO! Sem vocês não seria possível desenvolver minhas atividades no trabalho e realizar meu mestrado em outra instituição.

Aos amigos do Laboratório de Zoonoses Bacterianas Aline Campelo, Leonardo Rusak e Rosana Macedo de Almeida por toda ajuda na bancada, na formatação e nas dicas respectivamente. Agradeço em especial ao Rodrigo Lisboa, por todo suporte para que este projeto pudesse se concretizar. Esse trabalho é nosso!

Aos amigos do Laboratório de Controle Microbiológico do Departamento de Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos/Fiocruz, Doutor Marcelo Luiz Lima Brandão e Greice Maria Silva da Conceição, agradeço a fundamental colaboração nas análises estatísticas. Muito obrigada por todo ensinamento e, principalmente pela paciência prestados na reta final do meu trabalho.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia agradeço pela dedicação, ensinamentos e todo aprendizado. Muito obrigada!

REIS, Cristhiane Moura Falavina. Avaliação das metodologias automatizadas VITEK 2[®] e MALDI-TOF/MS na identificação de cepas atípicas de *Listeria spp* isoladas de alimentos em diferentes regiões do Brasil. 91p. Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

RESUMO

Listeria monocytogenes é um patógeno humano responsável pela listeriose, uma doença transmitida por alimentos com alta taxa de mortalidade (20-30%) que afeta principalmente idosos, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. Embora não patogênica, o isolamento e identificação de *L. innocua* são de extrema importância já que podem indicar a presença de *L. monocytogenes*, uma vez que são espécies intimamente relacionadas e amplamente distribuídas no ambiente e nas plantas industriais de processamento de alimentos. Cepas atípicas do gênero *Listeria*, que não podem ser distinguidas de outras espécies usando apenas métodos fenotípicos convencionais, foram relatadas em humanos, inclusive em casos raros de septicemia e meningite por *L. innocua*. Nos últimos anos, várias alternativas foram propostas para uma identificação mais rápida de microrganismos, como métodos fenotípicos automatizados e a ionização por desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF/MS). O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia dos métodos automatizados VITEK[®] 2 e MALDI-TOF/MS na identificação de 94 cepas do gênero *Listeria* com perfil de identificação atípico, anteriormente caracterizado como *L. innocua* não tipável. Essas cepas foram isoladas de fontes alimentares de diferentes regiões do Brasil e depositadas na Coleção de *Listeria* - CLIST / LABZOO / IOC / Fiocruz. A identificação resultante por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando iniciadores específicos para as espécies mais comuns de *Listeria*, foi considerada a identificação correta e, apresentou um total de 31 linhagens identificadas como *L. innocua* (LI), 54 como *L. monocytogenes* (LM), 8 como *L. welshimeri* (LW) e 1 como *L. grayi* (LG). Na primeira análise o sistema automatizado VITEK[®] 2 identificou corretamente 74,19% das cepas de LI, 14,82% das cepas de LM e 75,0% das cepas de LW; já na segunda análise o VITEK[®] 2 identificou corretamente 83,87% das cepas de LI, 18,52% das cepas de LM e 100% das cepas de LW. Na primeira análise por MALDI-TOF/MS, 74,08% das cepas de LM foram identificadas corretamente, porém todas as cepas de LI e LW foram identificadas incorretamente; já na segunda análise foram identificadas corretamente 72,22% das LM e 25% das LW mas, o equipamento novamente falhou em identificar as cepas de LI. Tanto o VITEK[®] 2 quanto o MALDI-TOF/MS identificaram corretamente a cepa de LG em ambas análises. Nossos resultados demonstram que as metodologias automatizadas não foram capazes de discriminar as cepas atípicas do gênero *Listeria* e apontam para a necessidade do uso de testes complementares, como PCR e meios cromogênicos, para a correta identificação destas cepas.

Palavras-chave: *Listeria spp.* atípicas, alimentos, VITEK[®] 2, MALDI-TOF/MS

REIS, Cristhiane Moura Falavina. Avaliação das metodologias automatizadas VITEK 2[®] e MALDI-TOF/MS na identificação de cepas atípicas de *Listeria spp* isoladas de alimentos em diferentes regiões do Brasil. 91p. Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a human pathogen responsible for listeriosis, a foodborne disease with high mortality rates (20-30%) that mainly affects the elderly, newborns and immunocompromised people. Although not pathogenic, the isolation and identification of *L. innocua* is extremely important since they can indicate the presence of *L. monocytogenes*, since they are closely related and widely distributed in the environment and in food processing plants. Atypical strains of the genus *Listeria*, which cannot be distinguished from other species using only conventional phenotypic methods, have been reported in humans, including in rare cases of *L. innocua* septicemia and meningitis. In recent years, several alternatives have been proposed for faster identification of microorganisms, such as automated phenotypic methods and ionization by matrix-assisted laser desorption (MALDI-TOF/MS). The objective of this study was to evaluate the effectiveness of the automated methods VITEK[®] 2 and MALDI-TOF / MS in the identification of 94 strains of the genus *Listeria* with atypical identification profile, previously characterized as non-typable *L. innocua*. These strains were isolated from food sources in different regions of Brazil and deposited in the *Listeria* Collection - CLIST / LABZOO / IOC / Fiocruz. The resulting identification by Polymerase Chain Reaction (PCR), using specific primers for the most common species of *Listeria*, was considered the correct identification, and presented a total of 31 strains identified as *L. innocua* (LI), 54 as *L. monocytogenes* (LM), 8 as *L. welshimeri* (LW) and 1 as *L. grayi* (LG). In the first analysis, the automated system VITEK[®] 2 correctly identified 74.19% of the strains of LI, 14.82% of the strains of LM and 75.0% of the strains of LW; in the second analysis, VITEK[®] 2 correctly identified 83.87% of the strains of LI, 18.52% of the strains of LM and 100% of the strains of LW. In the first analysis by MALDI-TOF / MS, 74.08% of the strains of LM were correctly identified, but all strains of LI and LW were identified incorrectly; in the second analysis, 72.22% of the LM and 25% of the LW were correctly identified, but the equipment again failed to identify the strains of LI. Both VITEK[®] 2 and MALDI-TOF / MS correctly identified the LG strain in both analyzes. Our results demonstrate that automated methodologies were not able to discriminate atypical strains of the *Listeria* genus and point to the need for the use of complementary tests, such as PCR and chromogenic media, for the correct identification of these strains.

Key-words: *Listeria spp.* atypical, food, VITEK[®] 2, MALDI-TOF/MS.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Modelo de tabela 2X2 para cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia.....	56
Tabela 2 – Modelo para cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia.....	56
Tabela 3 – Identificação proteômica e bioquímica automatizada das amostras padrão.....	60
Tabela 4 - Identificação das amostras (1ºanálise) de acordo com VITEK®2.....	61
Tabela 5 - Identificação das amostras (2ºanálise) de acordo com VITEK®2.....	61
Tabela 6 - Identificação das amostras (1º análise) de acordo com MALDI-TOF/MS.....	63
Tabela 7 - Identificação das amostras (2º análise) de acordo com MALDI-TOF/MS.....	63
Tabela 8 – Cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia das análises realizadas por Vitek® 2 e MALDI-TOF/MS de acordo com as espécies.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 2 - VITEK 2 Compact® com cartões acoplados ao cassete.....	34
Figura 3 - Esquema representativo das etapas de identificação por MALDI-TOF/MS.....	40
Figura 4 - Identificação bioquímica convencional (ISO 11290-1:2017 :2017).	57
Figura 5 - Gel representativo da PCR multiplex com os iniciadores 23S e hly	58
Figura 6 - Gel representativo da confirmação das espécies através da PCR multiplex com os iniciadores in9, lgr e lwe7-571.....	59
Figura 7 - Gel representativo da PCR multiplex com os iniciadores lmo0737, lmo1118, ORF2110 e ORF2819.....	59
Figura 8 – Figura representativa da produção da fosfolipase C (PI-PLC) em meio ALOA.	62

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização antigênica dos sorotipos de <i>L. monocytogenes</i>	19
Quadro 2 - Distribuição dos sorotipos moleculares segundo Doumith <i>et al.</i> , (2004).	20
Quadro 3 - Surtos de listeriose descritos mundialmente de 1981 a 2019 (continua).	24
Quadro 4 - Diferenciação bioquímica das espécies mais comuns do gênero <i>Listeria</i> , segundo Rocourt <i>et al.</i> , 1983.	32
Quadro 5 - Testes referentes ao cartão para identificação de bactérias Gram positivas (Continua).	35
Quadro 6 - Qualificação do cartão GP de acordo com fabricante.	37
Quadro 7 - Intervalos de confiança de acordo com a coloração indicada pelo fabricante	41
Quadro 8 - Distribuição das amostras analisadas por estado, fonte e ano de isolamento (Continua).	47
Quadro 9 - Lista de amostras padrão utilizadas como controles nos ensaios de MALDI TOF/MS e Vitek® 2.	52
Quadro 10 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados neste estudo.	55

LISTA DE SIGLAS

ActA	Proteína polimerizadora da cauda de actina
ALOA	Ágar Listeria Ottavani e Agosti
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API	<i>Analytab Products INC</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain heart infusion
°C	Grau Celsius
CAMP	Teste de Christie-Atkins-Munch-Peterson
CBZOO	Coleção de Bactérias de Zoonoses
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHCA	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
CLIST	Coleção de Listeria
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTA	Doença transmitida por alimento
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
GP	Cartão para Gram positivos
<i>hly</i>	Gene da listeriolisina O
IN	Instrução Normativa
InIA	Proteína internalina A
InIB	Proteína internalina B
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LABZOO	Laboratório de Zoonoses Bacterianas
LLO	Listeriolisina O
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/ Mass Spectrometry</i>

MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NaCl	Cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC-PLC	Fosfatidil-colina fosfolipase C
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI-PLC	Fosfatidil-inositol fosfolipase C
<i>plcA</i>	Gene da fosfatidil-inositol fosfolipase C
<i>plcB</i>	Gene da fosfatidil-colina fosfolipase C
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SNC	Sistema nervoso central
SINAM	Sistema de Informações de Agravos de Notificações
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TGI	Trato gastrointestinal
US FDA	<i>United States Food and Drug Administration</i>
UV	Ultravioleta
VE-DTA	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos
VIDAS	<i>Vitek Immuno Diagnostic Assay System</i>
WDCM	<i>World Data Centre for Microorganisms</i>
WFCC	<i>World Federation for Culture Collections</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Caracterização do gênero.....	17
2.2	Taxonomia.....	17
2.3	Caracterização antigênica	18
2.4	<i>Listeria monocytogenes</i> e Listeriose	20
2.4.1	Doenças de transmissão alimentar.....	20
2.4.2	Listeriose	21
2.4.3	Formas de transmissão	22
2.4.4	Surtos de listeriose descritos mundialmente.....	23
2.4.5	Surtos de listeriose no Brasil	26
2.5	Fatores de virulência de <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.6	Métodos de identificação de patógenos.....	30
2.6.1	Testes Bioquímicos automatizados	34
2.6.2	Métodos moleculares baseados em detecção do DNA ..	37
2.6.3	Espectrometria de massas	39
3	JUSTIFICATIVA	43
4	OBJETIVOS	45
4.1	Objetivo Geral.....	45
4.2	Objetivos específicos.....	45
5	METODOLOGIA	46
5.1	Origem dos isolados	46
5.2	Identificação bioquímica e caracterização antigênica	49
5.3	Identificação bioquímica automatizada (VITEK 2 Compact® - BioMérieux).....	50
5.4	Avaliação da produção da fosfolipase C (PI-PLC).....	51
5.5	Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF/MS – BioMérieux®	51
5.6	Identificação e Caracterização Molecular.....	53
5.6.1	Extração de DNA	53
5.6.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	53

5.7	Análise estatística	56
6	RESULTADOS	57
6.1	Identificação bioquímica convencional	57
6.2	Identificação e caracterização molecular	57
6.3	Identificação proteômica e bioquímica automatizada das amostras padrão.....	60
6.4	Identificação bioquímica automatizada (VITEK 2 Compact®)....	61
6.5	Avaliação da produção da fosfolipase C (PI-PLC).....	62
6.6	Identificação proteômica (MALDI-TOF/MS – BioMérieux®)	62
6.7	Avaliação da sensibilidade, especificidade e acurácia dos sistemas de identificação	63
7	DISCUSSÃO	66
8	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) ocupam uma posição cada vez mais destacada na saúde pública, razão pela qual foram estabelecidas rigorosas medidas de vigilância epidemiológica e sanitária, que residem na implementação de estudos sobre os agentes etiológicos envolvidos nas DTAs e suas características epidemiológicas. Tais resultados revertem em subsídios para as medidas de prevenção e controle. No Brasil, os dados epidemiológicos das DTAs ainda são incipientes, pois somente alguns estados e/ou municípios dispõem de detalhes estatísticos sobre os agentes etiológicos mais incidentes ou prevalentes, assim como a frequência dos alimentos envolvidos, as populações de maior risco e outros fatores associados (Ministério da Saúde- Manual Integrado VE-DTA, 2015).

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (ANVISA/MS), as DTAs são definidas como doenças causadas pela ingestão de alimento contaminado por um agente infeccioso específico ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente, ou de seu produto tóxico (ANVISA, 2001). Esta RDC determina a ausência de *L. monocytogenes* em cada 25 gramas do alimento analisado. No entanto, a regulamentação está limitada a determinados tipos de queijo, como aqueles de média umidade, alta umidade e muito alta umidade (ANVISA, 2001). Já a Instrução Normativa (IN) nº 9, de 8 de abril de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), exige procedimentos de controle de *L. monocytogenes* em estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal prontos para o consumo, com objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade dos alimentos através da coleta pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) (MAPA, 2009).

Entretanto em 26 de dezembro de 2019, entrou em vigor a RDC nº 331/2019, que abrange toda a cadeia produtiva de alimentos e engloba todos os setores envolvidos nas etapas de produção, industrialização, armazenamento, fracionamento, transporte, distribuição, importação e comercialização dos alimentos. Entre as determinações, os alimentos não poderão conter microrganismos patogênicos, toxinas ou metabólitos em quantidades que causem danos à saúde. Complementar a RDC, em 23 de dezembro desse mesmo ano, entrou em vigor a IN nº 60/2019, que define as listas de padrões microbiológicos para alimentos prontos para consumo (ANVISA, 2019).

Dentre as DTAs, destacamos a listeriose associada ao gênero *Listeria* que se encontra amplamente distribuído na natureza, sendo isolados de solo, água, vegetação, hortaliças, frutos, esgoto, fezes de animais e humanos, em áreas de processamento de alimentos, nos próprios alimentos e nos ambientes de criação de animais (HOFER & REIS, 2005; GOMES, 2015; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001). As espécies contidas no gênero são caracterizadas como bacilos curtos (0,5 a 2,0 µm de comprimento), Gram-positivos, anaeróbio facultativo, não formador de endosporos e cápsula, catalase positivo, oxidase negativo e apresentam mobilidade característica em forma de “guarda-chuva”, quando incubado em meio semi-sólido entre 20 e 30°C. (SCHUCHAT *et al.*, 1991; HOFER & REIS, 2005; CRUZ *et al.*, 2008; GOMES, 2015).

A principal espécie, *Listeria monocytogenes*, é o agente etiológico da listeriose, uma doença predominantemente veiculada por alimentos, constituindo-se em um sério agravo de saúde pública mundial, resultando em diversos quadros clínicos como meningite, septicemia e aborto (HOFER & REIS, 2005). Os sintomas gastrintestinais, como náusea, vômitos e diarreia, precedem ou acompanham as manifestações mais graves da doença. Os principais grupos de risco estão representados pelas mulheres grávidas, recém natos, crianças, idosos com ou sem processos crônicos degenerativos e indivíduos imunossuprimidos, evidenciando elevada taxa de mortalidade (HUANG *et al.*, 2011).

A espécie é mundialmente reconhecida como um dos cinco principais agentes de origem alimentar, no entanto, a listeriose é uma doença rara e com baixa incidência (CDC, 2019b). Do ponto de vista bacteriológico, apresenta perfil fenotípico semelhante a *L. innocua*, diferenciando-se principalmente pela presença da hemolisina, um dos principais fatores de virulência em *L. monocytogenes* (MORENO *et al.*, 2014a).

L. innocua não apresenta patogenicidade para o homem, porém seu isolamento e identificação são de extrema importância já que a espécie apresenta o mesmo habitat que *L. monocytogenes*, podendo ser considerada risco de contaminação cruzada, além indicar falta de condições higiênicas satisfatórias durante o processamento dos alimentos ou durante as etapas posteriores como armazenamento, transporte e manipulação (MURRAY, 1995).

Embora não patogênica, casos raros de septicemia e meningite por *L. innocua* foram relatados em humanos. Moura *et al.* (2019) citam o primeiro relato de *L. innocua*

atípica em 2004 e descrevem isolados da espécie em frutos do mar na Ásia, em suínos na América do Norte e em aves na Europa, sugerindo uma disseminação mundial.

Nos últimos anos, cepas de *L. innocua* e *L. monocytogenes* com perfil atípico vem sendo detectadas em alimentos e no meio ambiente (MORENO *et al.*, 2014).

A existência dessas cepas atípicas indica que os métodos tradicionais de caracterização fenotípica devem ser associados a métodos genotípicos visando o aprimoramento da identificação de *Listeria* spp. Várias alternativas têm sido propostas para a identificação de microrganismos em alimentos, recorrendo aos testes de diagnóstico rápido, com elevada especificidade e sensibilidade. Salienta-se nesse particular que alguns processos são, inclusive, capazes de distinguir diversas espécies de *Listeria* (ANDRADE *et al.*, 2010; KLJUJEV *et al.*, 2018; AMAJOURD *et al.*, 2018; TSUKIMOTO & ROSSI, 2018; SMITH *et al.*, 2019).

A tendência atual é que novas metodologias moleculares e espectrométricas sejam gradativamente introduzidas e propagadas, em decorrência dos critérios de precisão, sensibilidade e especificidade (TSUKIMOTO & ROSSI, 2018). Entretanto, a aquisição dos equipamentos de alto custo e a necessidade de pessoal treinado para a execução das técnicas se apresentam como obstáculos para a utilização rotineira das novas metodologias (GASANOV *et al.*, 2005; ROSIMIN *et al.*, 2016; KLJUJEV *et al.*, 2018; TSUKIMOTO & ROSSI, 2018).

Ensaio moleculares têm sido desenvolvidos para identificar os principais sorogrupos de *L. monocytogenes* associados com listeriose (CAMARGO *et al.*, 2016). Uma vez que a infraestrutura entra em vigor, as despesas laboratoriais tornam-se limitadas já que os testes são relativamente simples e de rápida execução. Camargo e colaboradores (2016) descrevem o ensaio de Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a técnica de PCR multiplex descrita por Doumith *et al.* (2004) como um protocolo eficaz na identificação dos sorogrupos da espécie patogênica.

Apesar dos impactos econômicos e outros já referidos, destaca-se na atualidade a utilização da tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/ Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS), na identificação de espécies bacterianas de importância clínica, tendo em vista a facilidade da execução dos protocolos, a liberação imediata dos resultados e o baixo custo por análise (KOHLMANN *et al.*, 2015; STAROSTIN *et al.*, 2015; CELANDRONI *et al.*, 2016; ANGELETTI, 2017; HOU *et al.*, 2019).

Com base em relatos da literatura sobre a existência de cepas atípicas pertencentes ao gênero *Listeria*, surgiu o interesse em investigar e identificar cepas pertencentes ao acervo da Coleção de *Listeria* do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz (CLIST) classificadas inicialmente como *Listeria innocua* não tipáveis.

O Laboratório de Zoonoses Bacterianas foi oficialmente constituído pelo credenciamento em 1992 e, mantém criopreservadas cepas oriundas de diversas regiões do país desde a década de 50 do século passado. Em 2010, a Coleção de Cultura de Bactérias de Interesse em Saúde foi credenciada e publicada em Diário Oficial e criou-se a subcoleção de *Listeria*, nomeada inicialmente de Coleção de Bactérias de Zoonoses (CBZOO).

Finalmente, em 2012 a Coleção de *Listeria* (CLIST) foi reconhecida institucionalmente e filiou-se à *World Federation for Culture Collections* (WFCC) sob o registro WDCM 1055 (http://www.wfcc.info/ccinfo/collection/by_id/1055).

Atualmente, além de desenvolver projetos de pesquisa específicos, a CLIST presta serviços especializados às instituições públicas de pesquisa e ensino com a finalidade de desenvolver pesquisas científicas, colaborando assim com a ciência e pesquisa no país.

As cepas depositadas na CLIST foram consideradas como atípicas por não apresentarem a expressão da hemólise total e, não aglutinarem com soros específicos para espécie *L. innocua*, razão pela qual foram caracterizadas inicialmente como *L. innocua* não tipáveis, tornando-se objeto de importância para saúde pública, considerando que o patógeno poder ser subdiagnosticado por não ter sido identificado corretamente pela metodologia convencional. Tal investigação ofertará subsídios com o intuito de identificar corretamente a espécie e auxiliar na instituição de medidas de controle específicas de bactérias transmitidas por alimentos em nosso país.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Caracterização do gênero

O gênero *Listeria* é constituído por pequenos bastonetes e/ou cocobacilos Gram-positivos, desprovidos de cápsula e não formadores de esporos. Possuem flagelos ativos a temperatura inferior a 30°C, conferindo uma mobilidade característica, comparável a figura de um “guarda-chuva”. São anaeróbios facultativos, com ação fermentativa sobre a glicose e suportam uma faixa de pH entre 6,0 e 9,0. São halotolerantes, podendo multiplicar-se em concentrações de até 20% de cloreto de sódio (NaCl) e sobrevivem a uma temperatura entre 4 e 45°C, o que lhes confere caráter psicrófilo (HOFER & HOFER, 2005; CRUZ *et al.*, 2008; BAKA *et al.*, 2015).

O referido gênero apresenta-se amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado no solo, silagem, efluentes de esgoto, cursos d’água e de maneira secundária em mais de 50 espécies de animais, incluindo ruminantes, suínos, equinos, cães, gatos, e várias espécies de aves. Devido ao seu caráter ubiquitário e à capacidade de sobreviver e se multiplicar em temperatura de refrigeração, algumas espécies de *Listeria* podem ser isoladas em uma infinidade de alimentos, como o leite e seus derivados, vegetais crus, carnes mal cozidas, frutos do mar, alimentos prontos para o consumo e aqueles conservados por muito tempo sob refrigeração, assumindo grande importância para a indústria de alimentos (HOFER & REIS, 2005; GOMES, 2015).

2.2 Taxonomia

Em 1911, Hülphers (apud Seeliger 1979) isolou em fígado de coelho uma bactéria denominada de *Bacillus hepatis*, sendo provavelmente a primeira observação de *Listeria* em animais. Em 1926, durante uma epizootia em animais de laboratório (coelhos e cobaias) do biotério da Universidade de Cambridge, Murray e colaboradores (1926), descreveram o agente como *Bacterium monocytogenes*. No ano seguinte, em homenagem a Lord Joseph Lister, Pirie (1927) estudando uma epizootia em roedores na África do Sul, isolou de fígado uma bactéria que recebeu a denominação de *Listerella hepatolytica*. Finalmente, em 1940, o microrganismo foi classificado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes* (PIRIE, 1940), sendo

progressivamente encontrado em mais de 42 espécies de mamíferos (incluindo o homem) e 17 espécies de aves, além de ser isolado de peixes, crustáceos, ácaros e insetos (SEELIGER 1961; GRAY & KILLINGER 1966).

Atualmente, o gênero é composto por 22 espécies e 4 subespécies, - segundo a “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature II” - denominadas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. rocourtiae*, *L. riparia*, *L. marthii*, *L. aquatica*, *L. booriae*, *L. floridensis*, *L. grandensis*, *L. newyorkensis*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. murrayi*, *L. thailandensis*, *L. goaensis*, *L. cornellensis*, *L. costaricensis*, *L. denitrificans*, *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*, *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*, *L. fleischmannii* subsp. *fleischmannii* e *L. fleischmannii* subsp. *coloradonensis* (DOIJAD *et al.*, 2018; <https://www.bacterio.net>).

Dessas espécies, apenas *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são patogênicas para animais e humanos, respectivamente. As espécies *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis* foram descritas e inseridas no gênero em 2014 por Bakker *et al.*, isoladas a partir de amostras ambientais de água nos estados do Colorado e Flórida, nos Estados Unidos. As espécies *L. booriae* e *L. newyorkensis* foram descritas posteriormente, em 2015, isoladas de ambientes de processamento de alimentos nos Estados Unidos (WELLER *et al.*, 2015).

2.3 Caracterização antigênica

As espécies de *Listeria* são caracterizadas por seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H). A principal espécie patogênica, *L. monocytogenes*, está constituída de 13 sorotipos (Quadro 1) diferenciados pelas frações O e H (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7), alguns dos quais são compartilhados em *L. innocua* e *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* seja representada por apenas três sorotipos (6a, 6b e 6ab), muitas vezes é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*.

A grande heterogeneidade antigênica do envelope externo das espécies citadas pode estar relacionada ao amplo número de animais hospedeiros nos quais são encontradas (HOFER & REIS, 2005; JAY, 2005).

Quadro 1 - Caracterização antigênica dos sorotipos de *L. monocytogenes*.

Sorotipo	Antígeno Somático (O)	Antígeno flagelar(H)
1/2a	I, II, (III)	A, B
1/2b	I, II, (III)	A, B, C
1/2c	I, II, (III)	B, D
3a	II, (III), IV	A, B
3b	II, (III), IV, (XII), (XIII)	A, B, C
3c	II, (III), IV, (XII), (XIII)	B, D
4a	(III), (V), VII, IX	A, B, C
4ab	(III), V, VI, VII, IX, X	A, B, C
4b	(III), V, VI	A, B, C
4c	(III), V, VII	A, B, C
4d	(III), V, VII	A, B, C
4e	(III), V, VI, VII	A, B, C
7	(III), XII, XIII	A, B, C

As frações somáticas entre parênteses podem estar ausentes: (III), (V), (XII) ou (XIII).
Adaptado de Farber & Peterkin, 1991.

Embora a sorotipificação por aglutinação em lâmina (rápida) e tubo (lenta) seja universalmente utilizada e aceita para caracterização dos sorotipos, na atualidade, recorre-se a caracterização molecular, por PCR, baseada em 4 genes marcadores para determinação dos sorogrupos (Quadro 2). Os fragmentos amplificados apresentam funções putativas, sendo *Imo 0737* e *orf 2819* de reguladores transcricionais, *Imo 1118* de proteína e *orf 2110* de proteína secretória.

Esta técnica foi desenvolvida por Doumith *et al.* em 2004, como uma alternativa à sorotipificação tradicional, tendo em vista ser onerosa e trabalhosa a padronização dos antissoros, além da necessidade de conhecimento técnico especializado (BORUCKI & CALL, 2003; LECLERCQ *et al.*, 2011).

Quadro 2 - Distribuição dos sorotipos moleculares segundo Doumith *et al.*, (2004).

Gene	Tamanho do produto (pb)	Especificidade			
		1/2a-3a	1/2c-3c	1/2b-3b	4b-4d-4e
lmo 1118	906	-	+	-	-
lmo 0737	691	+	+	-	-
orf 2110	597	-	-	-	+
orf 2819	471	-	-	+	+

+ : presença do fragmento

- : ausência do fragmento

pb: pares de bases

Dentre os sorotipos identificados na espécie *L. monocytogenes*, citam-se os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c como aqueles mais frequentemente isolados de alimentos e de ambientes de processamento dos produtos alimentícios (VALLIM *et al.*, 2015). No entanto, os tipos antigênicos 1/2a, 1/2b e 4b representam aproximadamente 95% dos casos de listeriose humana registrados mundialmente (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007), incluindo o Brasil (REIS *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2015;).

A linhagem 4b é comumente associada aos surtos, sendo responsável por mais de 50% dos casos humanos, enquanto os tipos do sorogrupo 1/2 são os mais isolados em alimentos (BORUCKI *et al.*, 2003). Esse fato sugere que o sorotipo 4b adapta-se melhor aos tecidos de células de hospedeiros mamíferos do que os tipos do sorogrupo 1/2 (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

2.4 *Listeria monocytogenes* e Listeriose

2.4.1 Doenças de transmissão alimentar

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são aquelas de natureza infecciosa ou tóxica causadas pela ingestão de alimentos ou água contaminados por agentes biológicos, químicos e físicos, representando um sério risco à saúde (BRASIL, 2015).

As DTAs apresentam uma importância cada vez maior na saúde pública, por gerarem ações de vigilância epidemiológica e sanitária. É de fundamental importância

o desenvolvimento de estudos que avaliem constantemente os agentes etiológicos envolvidos nas DTAs e suas características epidemiológicas, fornecendo assim, subsídios para a sua prevenção e controle (Ministério da Saúde- Manual Integrado VE-DTA, 2015).

No Brasil, mesmo com a criação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA), implantado em 1999 para reduzir a incidência e subsidiar medidas de prevenção e controle para as DTAs, os surtos ainda são subnotificados e subdiagnosticados (DE MELO *et al.*, 2018).

2.4.2 Listeriose

A listeriose é uma das doenças mais graves transmitidas por alimentos. Quando comparada a outras DTAs, apresenta baixa incidência, porém é uma doença grave com letalidade em torno de 20 a 30% dos casos (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2008), o que a torna de grande interesse na saúde pública. É uma doença relativamente rara com 0,1 a 10 casos por 100 mil pessoas por ano, dependendo dos países e regiões do mundo (EFSA, 2014; WHO, 2018).

A infecção provocada por *L. monocytogenes* pode se manifestar de duas formas: Infecção não invasiva e invasiva. A infecção não invasiva ocorre predominantemente em adultos saudáveis, caracterizando-se por sintomas similares aos da gastroenterite, tais como diarreia, dores abdominais, vômito e febre. O período de incubação varia de 11 horas a sete dias e, após o período, na maioria dos casos, os sintomas desaparecem espontaneamente sem o recurso do tratamento com antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2016).

A forma invasiva da infecção é sistêmica, o patógeno realiza a translocação intestinal com posterior disseminação pelas correntes sanguínea e linfática, atingindo os linfonodos (CRUZ *et al.*, 2008). Em adultos, a manifestação mais comum de listeriose é a meningoencefalite (55 a 70% dos casos). O período de incubação é longo, variando de 3 a 70 dias, fato que dificulta identificar o agente causador e rastrear sua origem. Além de causar infecções no sistema nervoso central (SNC), a disseminação desse microrganismo é responsável por casos de infecção da corrente sanguínea (bacteremia/septicemia), aborto, pneumonia, endocardite, hepatite,

abscessos localizados, lesões cutâneas e conjuntivite (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

Sintomas gastrintestinais como náusea, vômitos e diarreia, podem preceder ou acompanhar essas manifestações mais graves da doença, sendo os principais grupos de risco crianças, mulheres grávidas, indivíduos imunodeprimidos e idosos (HUANG *et al.*, 2011).

O tratamento de escolha para a listeriose invasiva consiste na administração de altas doses de ampicilina intravenosa. Estudos *in vitro* demonstram sinergismo entre a ampicilina e um aminoglicosídeo (gentamicina), razão pela qual, por vezes, é recomendada tal associação (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007).

2.4.3 Formas de transmissão

L. monocytogenes pode ser transmitida para o homem através do contato direto com animais infectados/doentes, como em casos relatados acometendo veterinários e fazendeiros que resultaram em lesões cutâneas (HOFER & REIS, 2005).

No entanto, a principal forma de transmissão da *L. monocytogenes* para humanos ocorre através do consumo de alimentos de origem animal e vegetal contaminados, os quais tem sido implicados na ocorrência de casos esporádicos e surtos de listeriose mundialmente (WHO, 2018).

De acordo com o US FDA (United States Food and Drug Administration), os principais alimentos alvo da *Listeria* são: salsicha, queijo, patê, frutos do mar, leite não pasteurizado e seus derivados. Em queijos, esse microrganismo consegue sobreviver à fermentação e às diferentes faixas de pH atingidas, ao mesmo tempo que consegue crescer na presença de outros microrganismos. O estudo desenvolvido por Desai e colaboradores (2019) cita o leite não pasteurizado, produtos lácteos, variedades de queijo mole, salsichas, carnes fatiadas, patês e frutos do mar defumados e refrigerados como os alimentos mais envolvidos em surtos de listeriose.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos, aponta a ingestão de água e alimentos contaminados como a principal via de transmissão da listeriose, sendo a maior parte dos casos diagnosticados e notificados encontrados na Europa e nos Estados Unidos (CDC, 2019a). Concomitantemente, segundo Hofer *et al.*, 2006, é provável que grande parte dos casos humanos

esporádicos tenham os alimentos como mecanismo de transmissão da doença. A estimativa realizada nos EUA indicou que cerca de 1.600 pessoas sejam infectadas, resultando em 260 mortes por ano, devido à listeriose (CDC, 2019a).

2.4.4 Surtos de listeriose descritos mundialmente

Até 1961, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do gênero, causadora da listeriose, tornando-se importante patógeno no início dos anos 1980, quando vários surtos da doença foram relatados na Europa, Estados Unidos e Canadá e, desde então se constitui em um grande problema de saúde pública mundial (CRUZ *et al.*, 2008).

O primeiro surto comprovado e documentado da doença foi registrado em 1981 no Canadá, associado ao consumo de salada de repolho cru e resultando em 18 óbitos. Desde então, diversos surtos foram relatados em vários países da América do Norte e Europa (Quadro 3) e, em 1988 foi considerada um importante patógeno de origem alimentar pela Organização Mundial de Saúde (HOF & ROCOURT, 1992).

Durante a década de 80 foram relatados alguns surtos de grande importância, os quais demonstraram a veiculação da bactéria através dos alimentos (SCHUCHAT *et al.*, 1991). Na maioria dos surtos, menos de 100 pessoas foram acometidas, entretanto, em 1997 foi registrado o maior número de casos na Itália envolvendo 1.566 indivíduos (McLAUHLIN *et al.*, 2004).

Outro grande surto de listeriose ocorreu em 2011 nos Estados Unidos, causado por contaminação em melões da espécie cantaloupe, acometendo consumidores em 28 estados, registrando 147 casos, causando 33 óbitos e um aborto (CDC, 2011).

Em 2016 a União Europeia notificou 2555 casos confirmados de listeriose com as taxas mais altas detectadas em crianças com menos de 1 ano de idade (1,3 por 100 000 habitantes) e entre os idosos com mais de 64 anos (1,6 por 100 000). No mesmo ano, na França, foram notificados 375 casos (DESAI *et al.*, 2019).

Em 2018, a África do Sul enfrentou o maior surto de listeriose já registrado, com 1060 casos e 216 óbitos. O alimento identificado como responsável foi um produto a base de carne processada pronto para consumo chamado Polony, amplamente consumido na região (SMITH *et al.*, 2019; EFE, 2019; WHO, 2018).

O caso mais recente data de abril de 2019 e descreve um surto envolvendo oito pessoas infectadas com *L. monocytogenes* e um óbito relatado em Michigan (CDC, 2019a).

Quadro 3 - Surtos de listeriose descritos mundialmente de 1981 a 2019 (continua).

Ano	País	Casos (óbitos)	Alimento envolvido
1981	Canadá	41 (18)	Repolho cru
1983	Estados Unidos	49 (14)	Leite pasteurizado
1983	Suíça	122 (34)	Queijo pasta mole
1985	Estados Unidos	142 (48)	Queijo pasta mole tipo mexicano
1988	Reino Unido	>300 (ND)	Patê
1989	Estados Unidos	10 (ND)	Camarão
1992	França	279 (85)	Frios
1993	Itália	18 (ND)	Salada de arroz
1994	Estados Unidos	48 (ND)	Leite achocolatado pasteurizado
1994	Finlândia	5 (ND)	Truta defumada
1997	Itália	1556 (ND)	Salada de milho e atum
1998	Estados Unidos	105 (ND)	Cachorro-quente
1999	Estados Unidos	2 (ND)	Frios
1999	Estados Unidos	5 (ND)	Frios

Quadro 3 - Surtos de listeriose descritos mundialmente de 1981 a 2019 (continuação).

Ano	País	Casos (óbitos)	Alimento envolvido
1999	Estados Unidos	4 (ND)	Cachorro-quente
2000	Estados Unidos	30 (ND)	Frios
2000	Estados Unidos	13 (ND)	Queijo fresco
2001	Estados Unidos	6 (ND)	Frios
2001	Japão	38 (ND)	Queijo
2002	Estados Unidos	54 (ND)	Frios
2003	Estados Unidos	12 (ND)	Queijo fresco
2003	Estados Unidos	3 (ND)	Desconhecido
2004-2007	Estados Unidos	135 (22)	Queijo fresco
2006	Suíça	8 (3)	Queijo “tomme”
2007	Estados Unidos	5 (3)	Leite pasteurizado aromatizado
2007	Noruega	17 (3)	Queijo camembert
2007	Estados Unidos	5 (3)	Leite pasteurizado
2008	Canadá	57 (22)	Alimento pronto pra consumo
2008	Estados Unidos	5 (3)	Salada de atum
2008	Canadá	57 (24)	Carne processada
2009	Austrália	36 (4)	Carne de frango
2009	Dinamarca	8 (2)	Carne bovina
2010	Austrália	9 (2)	Melão
2010	Estados Unidos	10 (5)	Aipo em cubos
2011	Estados Unidos	147 (33)	Melão cantaloupe
2012	Estados Unidos	22 (4)	Queijo ricota
2013	Estados Unidos	6 (1)	Queijo
2014	Estados Unidos	8 (1)	Queijo
2014	Estados Unidos	32 (7)	Maçãs carameladas
2015	Estados Unidos	10 (3)	Sorvete

Quadro 3 - Surtos de listeriose descritos mundialmente de 1981 a 2019 (concluído).

Ano	País	Casos (óbitos)	Alimento envolvido
2015	Estados Unidos	30 (3)	Queijo
2016	Estados Unidos	19 (1)	Saladas embaladas
2016	Estados Unidos	2 (1)	Leite cru
2016	Estados Unidos	9 (3)	Vegetais congelados
2017	Estados Unidos	8 (2)	Queijo
2018	África do Sul	1060 (216)	Carne processada (Polony)
2019	Estados Unidos	8 (1)	Carne processada e queijo

Fonte: Adaptado de Camargo *et al.*, 2015b e CDC, 2019a.
 ND: não determinado.

2.4.5 Surtos de listeriose no Brasil

No Brasil, a ocorrência de listeriose de origem alimentar é rara. Provavelmente esse fato esteja relacionado a ausência de notificação dos casos (BRASIL, 2006), à precariedade do sistema de saúde pública nacional, aliada a dificuldade de isolamento do patógeno, além de provável predominância de casos esporádicos, que não são relatados.

Alguns relatos da doença ocorreram no Brasil, como exemplo no ano de 1985, onde foram observados cinco casos de listeriose em pacientes renais transplantados em um mesmo hospital em São Paulo, prevalecendo o sorotipo 4b (HOFER *et al.*, 1999). Em 1989, três casos de meningite bacteriana causada por *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a e 4b foram diagnosticados no Instituto de Saúde do Distrito Federal (HOFER *et al.*, 1998; BARBOSA *et al.*, 2015).

Landgraf e colaboradores, em 1999 relataram três óbitos em São Paulo provenientes de um surto de meningite em recém-nascidos causado por *L. monocytogenes*. Ainda em São Paulo, Lemes-Marques *et al.*, (2007) relataram 12 casos clínicos de listeriose ocorridos no período de 1995 a maio de 2005 na região sudoeste do Estado.

No período de 2000 a 2015, no Brasil, foram oficialmente registrados apenas dois surtos de listeriose associados a alimentos (BRASIL, 2015). Novamente, acredita-se que esse fato esteja relacionado a não obrigatoriedade de notificação dos casos, além da dificuldade de isolamento do patógeno e sua associação com o alimento implicado (RODRIGUES, 2016).

Salienta-se que a listeriose ainda seja subdiagnosticada e subnotificada, não havendo registros de surtos no país (DE MELO *et al.*, 2018). Alguns autores citam *L. monocytogenes* presente em diversos produtos alimentícios por investigação no campo laboratorial (HOFER, 2001; HOFER *et al.*, 2006; CRUZ *et al.*, 2008; SANTOS & VIEIRA, 2013; VALLIM *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2015b).

Em 2015, Camargo e colaboradores detectaram *L. monocytogenes* em cortes de carne bovina, em mãos de manipuladores e em mesas de um abatedouro em Minas Gerais. No Rio Grande do Sul, Mendonça *et al.*, (2016) determinaram o perfil genotípico de *L. monocytogenes* isolada em frangos refrigerados e identificou a prevalência dos sorotipos 1/2a,1/2b,1/2c, como os mais frequentemente isolados de ambientes de processamento de alimentos.

Entre os anos de 2007 e 2016, foram notificados ao Ministério da Saúde, através do Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN), 6.632 surtos de DTAs com 118.104 doentes e 109 óbitos. De todas as notificações, 70,3% não tiveram seu agente etiológico identificado e, entre os que tiveram, nenhum estava relacionado ao gênero *Listeria* (BRASIL, 2016).

2.5 Fatores de virulência de *Listeria monocytogenes*

A década de 1980 pode ser considerada notória para a indústria alimentícia, pois além da descoberta de *L. monocytogenes* como um dos principais patógenos de origem alimentar, também marcou o início das investigações dos mecanismos de virulência de *Listeria* spp. (CRUZ *et al.*, 2008).

A atividade hemolítica, principal fator de virulência, está presente nas espécies patogênicas, mas não nas espécies não patogênicas (com a exceção de *L. seeligeri*), o que atraiu a atenção dos pesquisadores. Entre 1986 e 1989, foram realizados estudos para a descoberta do gene da hemolisina (*hly*) e elucidação do

papel chave que a hemolisina desempenha no escape da destruição dentro do fagossoma. Em 2001, VAZQUEZ-BOLAND e colaboradores, caracterizaram a hemolisina como primeiro fator de virulência como função crítica para a sobrevivência de um parasita dentro das células eucarióticas do hospedeiro.

L. monocytogenes pode infectar o homem principalmente por via oral sendo a forma mais comum de contaminação a ingestão de alimentos contaminados. Dessa forma, o trato gastrointestinal (TGI) é a principal porta de entrada no hospedeiro (PEARSON & MARTH, 1980; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001; CRUZ *et al.*, 2008). A espécie é um microrganismo intracelular facultativo que pode se multiplicar dentro de macrófagos, células epiteliais e hepatócitos. Apresenta um ciclo celular dividido em três etapas, que consistem em escape do fagossomo após a fagocitose, multiplicação na célula hospedeira e invasão da célula vizinha (Figura 1) (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

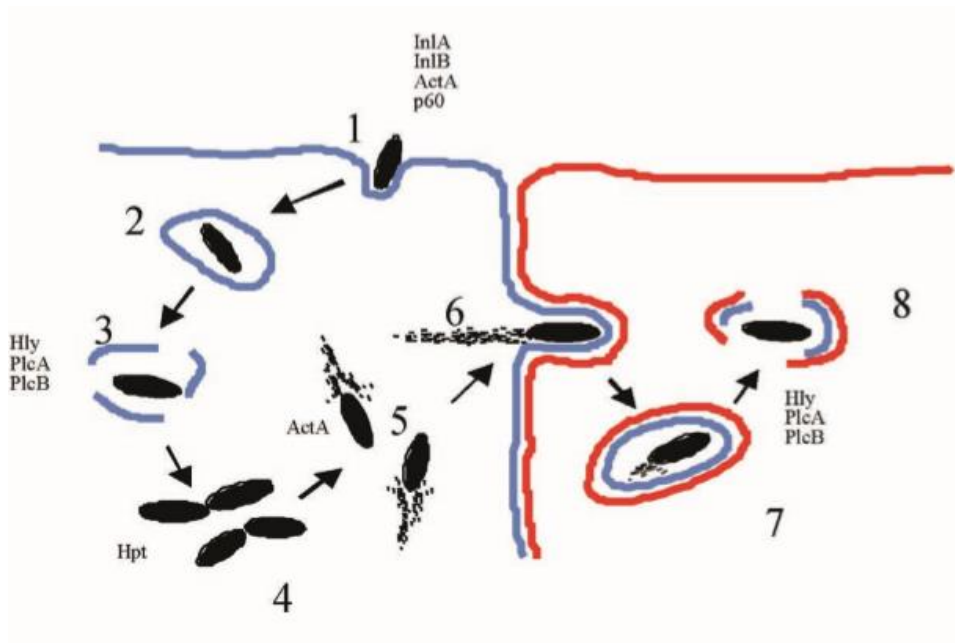


Figura 1- Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.

Fonte: Adaptado de VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001.

(1) A bactéria penetra no interior da célula, induzindo sua própria fagocitose. (2) Bactéria englobada em um fagossoma. (3) Escape pela ação da hemolisina e fosfolipases. (4) No citoplasma, inicia-se a sua multiplicação. (5) Fenômeno da motilidade intra e intercelular pela polimerização e formação da cauda de actina. (6) Através de movimento de tombamento, causado pelas caudas de actina, a bactéria invade a célula vizinha. (7) e (8) Reinicia um novo ciclo ao escapar do fagossomo.

Após o processo de internalização *L. monocytogenes* escapa do vacúolo (ou do fagossoma) sob ação de uma hemolisina formadora de poros – listeriolisina O (LLO), codificada pelo gene *hly* e duas fosfolipases: fosfatidil-inositol fosfolipase C (PI-PLC) e fosfatidil-colina fosfolipase C (PC-PLC), codificadas pelos genes *plcA* e *plcB*, respectivamente (PIZARRO-CERDÁ & COSSART, 2006). Uma vez livre no citoplasma, a bactéria se multiplica e se movimenta com auxílio da proteína Act A, responsável pela polimerização de estruturas ricas em actina e produtos do gene *Act A* (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

O gênero *Listeria* apresenta proteínas (invasinas) de superfície específicas denominadas internalinas A (InIA) e internalinas B (InIB), que são responsáveis pela adesão de *L. monocytogenes* na superfície das células epiteliais intestinais (CRUZ *et al.*, 2008).

Além disso, *L. monocytogenes* apresenta capacidade de sobreviver e multiplicar-se a temperaturas de refrigeração, suporta condições ambientais adversas e apresenta grande capacidade para formar biofilmes em superfícies de equipamentos, tornando-se um grave problema no ambiente industrial (GANDHI & CHIKINDAS, 2007). Klančnik e colaboradores (2015) relataram a capacidade de sobrevivência do patógeno em instalações e equipamentos devido a formação de biofilme e resistência aos desinfetantes além da higienização precária.

L. monocytogenes foi considerada altamente suscetível a antibióticos utilizados rotineiramente na clínica. Porém desde o primeiro relato de resistência antimicrobiana em 1988 associada ao gênero, foram descritos casos de resistência do patógeno em amostras de origem alimentar, ambiental e clínica (OBAIDAT *et al.*, 2015).

Reis e colaboradores (2011) avaliaram a susceptibilidade de espécimes clínicos humanos no período de 1970 a 2012 e, observaram a sensibilidade de todas as amostras à ampicilina, cefalotina, eritromicina, gentamicina, teicoplanina e vancomicina. Somente uma amostra apresentou resistência à rifampicina, enquanto duas foram resistentes a sulfametoxazol-trimetoprim.

Na análise de Moreno *et al.*, (2014b), em amostras isoladas de *L. monocytogenes* de abatedouros, suínos e amostras clínicas foi observado sensibilidade à penicilina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina e carbapenemas. A resistência antimicrobiana foi encontrada na daptomicina, clindamicina, e oxacilina,

enquanto a resistência intermediária foi descrita nas fluoroquinolonas. Concomitantemente, Camargo e colaboradores (2015a) relataram resistência à clindamicina e oxacilina em amostras de *L. monocytogenes* isoladas de ambientes de processamento de carne, produtos de carne bovina e casos clínicos.

2.6 Métodos de identificação de patógenos

No Brasil, os métodos analíticos utilizados atualmente para a detecção de patógenos bacterianos em alimentos ainda é o cultivo microbiológico convencional, seguindo protocolos padronizados pela Metodologia ISO 11290-1:2017 (International Organization for Standardization, 2017). Esta metodologia inclui uma etapa de enriquecimento em caldos com agentes seletivos, isolamento em meio sólido e identificação das colônias por testes bioquímicos e sorológicos (SILVA *et al.*, 2010). Todavia, são métodos demorados e caros, que não fornecem informações rápidas e precisas sobre as contaminações de alimentos, limitando a capacidade de proteger os consumidores de potenciais riscos microbianos (ROHDE *et al.*, 2015).

As dificuldades de técnicas de isolamento de *L. monocytogenes* datam da década de 60, quando Gray e Killinger apontaram a necessidade de aperfeiçoar as técnicas de isolamento e sugeriram que laboratórios de saúde pública, na medida do possível, enviassem as culturas suspeitas de *L. monocytogenes*, para centros de referência, devido às dificuldades de isolamento e caracterização de material contaminado (GRAY & KILLINGER, 1966).

Além disso, as técnicas convencionais de identificação baseadas em características fenotípicas podem dificultar a interpretação dos resultados quando estas não são expressas (VÄLIMAA *et al.*, 2015). Os testes bioquímicos podem ser variáveis frente à ação de fatores ambientais sobre a expressão gênica, quando se utiliza um número limitado de testes, gerando risco de interpretações errôneas e demora no processo de identificação microbiano (GANDRA *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2010).

A identificação de *L. monocytogenes* é frequentemente realizada através de análise microbiológica em meios de cultura específicos, associada aos métodos bioquímicos clássicos de identificação. O Agar ALOA é um meio cromogênico, seletivo para o isolamento prévio e identificação de *L. monocytogenes* e *Listeria spp* em

amostras clínicas e de alimentos, recomendado pela ISO 11290-1:2017. Um dos componentes da formulação, fosfatidilinositol, permite que a fosfolipase C (PI-PLC) produzida por *L. monocytogenes* seja detectada, produzindo um halo opaco ao redor das colônias. A coloração verde-azulada e a ausência do halo ao redor das colônias são características de *Listeria spp* (OTTAVIANI *et al.*, 1997).

Andrade *et al.* (2010) citam a técnica de enriquecimento a frio na recuperação de bactérias psicrótroficas, mas advertem quanto ao prolongado tempo de incubação, especialmente em situações de surto, o que veio a estimular a utilização de meios seletivos. Os autores ressaltam que a escolha do meio deve levar em consideração o tipo da amostra em teste e a possível microbiota acompanhante.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de avaliar os meios sólidos, quanto à recuperação e isolamento de *L. monocytogenes* em alimentos e, observa-se a prevalência dos meios seletivos PALCAM e OXFORD (PINTO *et al.*, 2001; TAHOUN *et al.*, 2017), além dos meios cromogênicos, como por exemplo ALOA.

A diferenciação entre as espécies do gênero é realizada através de testes de fermentação de carboidratos (D-Manitol, L-Ramnose, D-Xilose, α -D-manosídeo), produção de hemólise total em Agar Sangue de carneiro a 5%, incluindo teste de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) (Quadro 4), que detecta as reações sinérgicas de hemolisinas de *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* e *L. seeligeri* com a β -toxina de *Staphylococcus aureus* e com o exofator de *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* apresenta reação positiva com *S. aureus* e negativa com *R. equi*, enquanto *L. ivanovii* tem reação inversa e, *L. innocua* é negativa ao teste de CAMP.

Algumas espécies são beta-hemolíticas (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*) e as demais não produzem hemolisina. A inoculação em agar semi-sólido, incubação à temperatura de 20 a 25°C e seu crescimento a partir de 48 horas evidenciam a figura típica de um “guarda-chuva”. Na semeadura em placa com Agar Triptosado, as colônias visualizadas são acinzentadas, brilhantes sob iluminação normal e, de coloração azul esverdeada quando observadas sob a técnica de iluminação oblíqua (SCHUCHAT *et al.*, 1991).

Um dos maiores desafios para os microbiologistas é a ausência de um método totalmente eficaz para diferenciar *L. monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*, associadas na mesma amostra de alimento, especialmente *L. innocua* (DE ANDRADE *et al.*, 2014).

L. monocytogenes e *L. innocua* apresentam perfis bioquímicos semelhantes sendo diferenciados pela presença da hemolisina na espécie patogênica. Em contraste com *L. monocytogenes*, *L. innocua* não é patogênica para os mamíferos, embora casos excessivamente raros de septicemia e infecções por meningite tenham sido relatados em humanos e ruminantes causados por cepas de *L. innocua* atípicas (MOURA *et al.*, 2019).

MORENO e colaboradores (2014) realizaram a caracterização fenotípica e genotípica de amostras isoladas de suínos e descrevem *L. innocua* atípica por apresentarem baixa atividade hemolítica.

A presença de cepas atípicas relacionadas ao gênero *Listeria* desperta grande interesse para Saúde Pública, já que cepas patogênicas podem ser identificadas erroneamente e vice-versa, causando a disseminação das DTAs aumentando assim a subnotificação.

Quadro 4 - Diferenciação bioquímica das espécies mais comuns do gênero *Listeria*, segundo Rocourt *et al.*, 1983.

Testes	<i>Listeria</i>					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
β-Hemólise	+	-	+	+	-	-
CAMP (<i>S. aureus</i>)	+	-	-	+	-	-
CAMP (<i>R. equi</i>)	-/+	-	+	-	-	-
D -Manitol**	-	-	-	-	-	+
L – Ramnose	+	V	-	-	V	-
D –Xilose	-	-	+	+	+	-
α-D-manosídeo	+	+	-	-	+	+
Hidrólise esculina	+	+	+	+	+	+
Redução NO ₃ ⁻ – NO ₂ ⁻	-	-	-	-	-	-

*Algumas amostras não são hemolíticas em sangue de carneiro, cavalo ou bovino

** Leitura após 24-48 horas de incubação a 35-37°C.

(+): positivo; (-): negativo; (V): variável: 11 a 89% das amostras positivas.

Nos últimos anos várias alternativas têm sido propostas para a identificação de microrganismos em alimentos, através de testes de diagnósticos rápidos, específicos

e sensíveis. Alguns kits comerciais, como por exemplo o API (*Analytab Products INC*) *Listeria*[®] *System* e o VIDAS[®] (*Vitek Immuno Diagnostic Assay System*) (Biomerieux, 2019), capazes de distinguir diversas espécies de *Listeria* têm sido utilizados na tentativa de identificações mais rápidas e simples (ANDRADE *et al.*, 2010).

Oktay e Heperkan (2006) ao comparar o método ISO 11290-1:2017 (identificação convencional por provas bioquímicas) e VIDAS[®] obtiveram 100% de sensibilidade e especificidade para o VIDAS[®] em amostras de queijos, manteigas e batatas cozidas.

A metodologia VIDAS[®] foi citada como método adequado para identificação de *Listeria* spp em amostras de carne bovina e suína, necessitando de testes adicionais para confirmação de *L. monocytogenes* (MEYER *et al.*, 2011). Em 2013, Benetti e colaboradores relataram resultados favoráveis ao API quando comparados à metodologia ISO 11290-1:2017 para identificação de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em salsicha resfriada.

De Andrade e colaboradores (2014) isolaram pelo método tradicional amostras de *Listeria* sp. (carne moída bovina e salsichas tipo hot dog) e identificaram as espécies através da comparação entre os métodos API e metodologia molecular e, obtiveram concordância total na distinção das espécies de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por ambas as técnicas. Porém são métodos demorados e algumas vezes dependentes de provas bioquímicas adicionais para conclusão da identificação do microrganismo.

Os laboratórios de microbiologia clínica vêm utilizando a técnica de identificação bioquímica automatizada, através do equipamento Vitek 2 Compact[®] (GUO *et al.*, 2014). Este equipamento utiliza um software que permite a classificação das amostras através de um banco de dados frequentemente atualizado pelo fabricante.

Wallet *et al.* (2005) relataram o bom desempenho do equipamento em isolados clínicos e salientaram o nível de precisão de identificação altamente aceitável, assim como Tahoun *et al.* (2017), obtiveram bons resultados em amostras de leite cru. O maior surto de listeriose relatado na África ocorreu no período de janeiro de 2017 a julho de 2018 e a identificação bacteriana foi realizada por bioquímica automatizada através do Vitek 2 Compact[®] (SMITH *et al.*, 2019).

2.6.1 Testes Bioquímicos automatizados

O VITEK 2 Compact® é um sistema de identificação microbiana totalmente automatizado, o que proporciona uma otimização do fluxo de trabalho. Possui um vasto banco de dados que permite detectar uma variedade de microrganismos (Biomerieux, 2019). O sistema opera com cartões com códigos de barras, o que assegura uma completa rastreabilidade e o risco de erros de transcrição é minimizado (Figura 2). O tempo de preparação e de resultado final pode ser obtido num intervalo de 2 a 18 horas, dependendo do metabolismo da bactéria e do cartão utilizado. O software do VITEK 2 Compact® é extremamente intuitivo e, portanto, requer menos treinamento técnico, resultando em uma maior produtividade (Biomerieux, 2019).



Figura 2 - VITEK 2 Compact® com cartões acoplados ao cassete.

Fonte: Disponível em:

https://www.atcc.org/en/Documents/Marketing_Literature/Authentication_of_Prokaryotes_at_ATCC.aspx.

Acesso em: 27/04/2019.

O cartão GP, utilizado para bactérias Gram positivas, baseia-se em métodos bioquímicos que medem a utilização de carbono, resistência e atividade enzimática, totalizando 43 testes bioquímicos (Quadro 5).

A porcentagem de probabilidade é realizada pelo software através da comparação do conjunto de reações do teste com o conjunto de reações esperadas para cada microrganismo que possa ser identificado pelo equipamento. As reações observadas são comparadas com reações típicas de cada microrganismo, gerando um valor quantitativo. A probabilidade de porcentagem de 99% é obtida quando ocorre uma correspondência perfeita entre o padrão de reação do teste e o padrão de reação característico de um determinado microrganismo. Quando não se obtém uma

correspondência perfeita ainda é possível para o padrão de reação estar próximo ao padrão de reação esperado, de modo que possa ser fornecida uma decisão clara quanto à identificação do microrganismo.

O intervalo de porcentagem de probabilidades no caso de escolha única é de 85 a 99%. Os valores próximos a 99% indicam uma correspondência mais próxima do padrão típico para o microrganismo em questão. Os resultados obtidos são analisados com nível de confiança de acordo com tabela fornecida pelo fabricante (Quadro 6).

Quadro 5 - Testes referentes ao cartão para identificação de bactérias Gram positivas utilizando o VITEK 2 Compact® (Continua).

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/Poço
2	D-AMIGDALINA	AMY	0,1875 mg
4	FOSFATIDILINOSITOL FOSFOLIPASE C	PIPLC	0,015 mg
5	D-XILOSE	dXYL	0,3 mg
8	ARGININA DIHIDROLASE 1	ADH1	0,111 mg
9	BETA-GALACTOSIDASE	BGAL	0,036 mg
11	ALFA-GLUCOSIDASE	AGLU	0,036 mg
13	Ala-Fe-Pro ARILAMIDASE	APPA	0,0384 mg
14	CICLODEXTRINA	CDEX	0,3 mg
15	L-Aspartato ARILAMIDASE	AspA	0,024 mg
16	BETA GALACTOPIRANOSIDASE	BGAR	0,00204 mg
17	ALFA-MANOSIDASE	AMAN	0,036 mg
19	FOSFATASE	PHOS	0,0504 mg
20	Leucina ARILAMIDASE	LeuA	0,0234 mg
23	L-Prolina ARILAMIDASE	ProA	0,0234 mg
24	BETA-GLUCURONIDASE	BGURr	0,0018 mg
25	ALFA-GALACTOSIDASE	AGAL	0,036 mg
26	L-Pirrolidonil ARILAMIDASE	PyrA	0,018 mg
27	BETA-GLUCURONIDASE	BGUR	0,0378 mg
28	Alanina ARILAMIDASE	AlaA	0,0216 mg
29	Tirosina ARILAMIDASE	TyrA	0,0276 mg
30	D-SORBITOL	dSOR	0,1875 mg
31	UREASE	URE	0,15 mg
32	RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B	POLYB	0,00093 mg
37	D-GALACTOSE	dGAL	0,3 mg
38	D-RIBOSE	dRIB	0,3 mg
39	Alcalinização L-LACTATO	ILATk	0,15 mg
42	LACTOSE	LAC	0,96 mg
44	N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA	NAG	0,3 mg
45	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
46	RESISTÊNCIA À BACITRACINA	BACI	0,0006 mg

Quadro 5 - Testes referentes ao cartão para identificação de bactérias Gram positivas utilizando o VITEK 2 Compact® (Concluído).

Poço	Teste	Mnemónica	Quantidade/Poço
47	RESISTÊNCIA À NOVOBIOCINA	NOVO	0,000075 mg
50	CRESCIMENTO EM NaCl a 6,5%	NC6.5	1,68 mg
52	D-MANITOL	dMAN	0,1875 mg
53	D-MANOSE	dMNE	0,3 mg
54	METIL-B-D-GLUCOPIRANOSÍDEO	MBdG	0,3 mg
56	PULULANO	PUL	0,3 mg
57	D-RAFINOSE	dRAF	0,3 mg
58	RESISTÊNCIA O/129 (comp.vibrio.)	O129R	0,0084 mg
59	SALICINA	SAL	0,3 mg
60	SACAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
62	D-TREALOSE	dTRE	0,3 mg
63	ARGININA DIHIDROLASE 2	ADH2s	0,27 mg
64	RESISTÊNCIA À OPTOQUINA	OPTO	0,000399 mg

Nota: Os poços com números entre 1 e 64 não designados neste quadro estão vazios.

Fonte: Manual VITEK 2 Compact® (BIOMERIEUX, 2019).

Quando o padrão de reação não é suficiente para diferenciar entre dois a três microrganismos, as porcentagens de probabilidades refletem esta ambiguidade. Os valores de probabilidade reportados indicam, relativamente, a ordem pela qual o padrão de reação corresponde melhor às possibilidades enumeradas.

Contudo, a ordem não sugere que a correspondência do padrão a uma das possíveis identificações é claramente superior a outra. A característica de probabilidade de uma soma geral de 100% é retida através do processo de cálculo. Após resolução para uma escolha, é retida a característica de probabilidade de escolha única. Para escolha do microrganismo e/ou para resolver uma identificação multiopcional ou de fraca discriminação, o fornecedor indica a realização de testes suplementares (Anexo A).

O VITEK 2 Compact® é capaz de identificar as seguintes espécies do gênero *Listeria*: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, através das provas bioquímica e enzimáticas relacionadas no Quadro 5.

Quadro 6 - Qualificação do cartão GP de acordo com fabricante.

Nível de Confiança da Mensagem de ID	Escolhas	% de Probabilidade	Comentários
Excelente	1	96 a 99	
Muito Bom	1	93 a 95	
Bom	1	89 a 92	
Aceitável	1	85 a 88	
Baixa discriminação	2 a 3	Soma das escolhas = 100; após resolução para uma escolha, a percentagem de probabilidade reflecte o número associado à escolha seleccionada.	Dois a três grupos taxonómicos mostram o mesmo perfil biológico. Separe por testes suplementares. Necessário discriminar para haver correspondência com a carta de sensibilidade.
Inconclusivo ou Microrganismo não identificado	> 3 ou 0	n/a	Qualquer um dos > 3 grupos taxonómicos mostra o mesmo perfil biológico ou Perfil biológico muito atípico. Não corresponde a nenhum grupo taxonómico na base de dados. Verifique a coloração de Gram e a pureza.

Fonte: Manual VITEK 2 Compact® (BIOMERIEUX, 2019).

2.6.2 Métodos moleculares baseados em detecção do DNA

Os métodos moleculares são mais rápidos e confiáveis quando comparados aos métodos bioquímicos, porém, relativamente mais caros, necessitando de minuciosa técnica (JADHAV *et al.*, 2012).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método utilizado na detecção e identificação de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de produtos alimentícios e amostras clínicas. Gonçalves e colaboradores (2014) descreveram o método como sendo rápido e sensível na detecção de agentes patogênicos e citaram o crescimento gradativo da técnica nas indústrias de alimentos. Em seu trabalho os autores avaliaram o limite de detecção para *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* e demonstraram boa sensibilidade da técnica.

Hudson *et al.* (2001) descreveram a utilização da técnica para detecção do gene *hly*, que codifica a listeriolisina O (LLO), principal fator de virulência de *L. monocytogenes*. A PCR surge como uma ferramenta útil para confirmação dos sorotipos do gênero *Listeria* (DOUMITH *et al.*, 2004).

No Brasil, estudos realizados por Camargo e colaboradores (2016) citam a PCR multiplex desenvolvida por Doumith *et al.* (2004) com 100% de precisão na classificação sorotípica de *L. monocytogenes* oriundas de cortes de carne, amostras clínicas e ambientais isoladas no país. Concomitantemente, Palma e colaboradores (2016) obtiveram resultados positivos com a mesma metodologia em isolados oriundos de cortes bovinos e abatedouros no Distrito Federal.

Em amostras humanas e de origem alimentar no Brasil, Almeida e colaboradores (2017) confirmaram o sorogrupo de cepas de *L. monocytogenes* utilizando a metodologia de Doumith *et al.* (2004) e destacaram a prevalência dos tipos 4b e 1/2b em ambas as fontes.

A aplicação do método da PCR foi relatada por Liu e colaboradores (2004) para diferenciar *L. welshimeri* de outras espécies de *Listeria* e de bactérias Gram positivas. Ryu *et al.*, em 2013 desenvolveram uma PCR multiplex para detecção simultânea de seis espécies de *Listeria*, incluindo *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* em amostras de produtos cárneos.

Em 2016, Rosimin e colaboradores descreveram pela primeira vez, com sucesso, a utilização de uma PCR quadriplex para a discriminação simultânea de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua* atípica. Ainda em 2016 Pournajaf e colaboradores descreveram uma PCR multiplex que permite a confirmação rápida e simultânea de espécies de *L. monocytogenes* e sua virulência em amostras clínicas e não clínicas.

Tao *et al.* em 2017 confirmaram 28 cepas do gênero *Listeria*, previamente isoladas de alimentos e, obtiveram acurácia e sensibilidade na caracterização das espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* e *L. innocua* através de multiplex PCR. Já em 2018, Kljujev e colaboradores obtiveram sucesso com a técnica utilizando o marcador para gene *hly* e confirmaram a espécie *L. monocytogenes* em vegetais.

Metodologias moleculares baseadas no DNA e espectrométricas tem se tornado cada vez mais populares por apresentarem precisão, sensibilidade e especificidade. Entretanto, a aquisição desses equipamentos envolve alto custo havendo a necessidade de pessoal treinado para a realização das técnicas (GASANOV *et al.*, 2005).

2.6.3 Espectrometria de massas

Desde os anos 70 (CLAYDON *et al.*, 1996; ANHALT & FENSELAU, 1975), a espectrometria de massas de biomoléculas vem sendo utilizada e aperfeiçoada (SENG *et al.*, 2009) e atualmente é possível obter não somente o espectro de uma grande biomolécula (como proteínas), mas também um perfil de espectros de várias moléculas, que pode ser utilizado como um *fingerprinting* do microrganismo analisado (CARBONNELLE *et al.*, 2011).

A utilização da tecnologia *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight/ Mass Spectrometry* (MALDI-TOF/MS) tem se mostrado de grande relevância para a identificação de espécies bacterianas de importância clínica, devido à simples execução dos protocolos, à rápida liberação dos resultados e ao baixo custo por análise (KOHLMANN *et al.*, 2015; STAROSTIN *et al.*, 2015; CELANDRONI *et al.*, 2016).

A técnica de MALDI-TOF/MS, usada para a identificação de microrganismos, consiste na mistura da cultura a ser identificada com uma matriz polimérica (geralmente ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - CHCA) que absorve luz e permite a ionização das proteínas, por excitação através de um feixe de laser. Em seguida, campos elétricos orientam os íons gerados dentro de um tubo de vácuo, onde ocorre uma separação por massa/carga segundo o tempo de passagem pelo tubo até o detector (tempo de vôo). Cada partícula ionizada gera um pico (ou espectro) e o conjunto de partículas detectadas é convertido em um perfil de espectros (Figura 3).

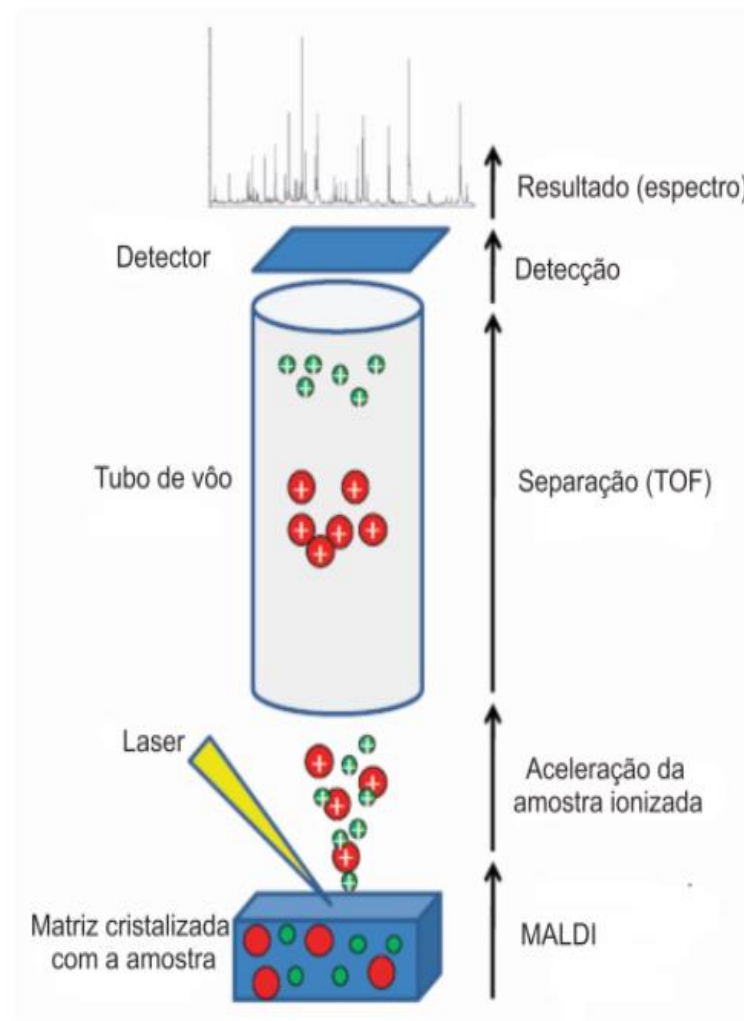


Figura 3 - Esquema representativo das etapas de identificação por MALDI-TOF/MS.

Fonte: Croxatto *et al.*, 2012.

Por meio de uma base algorítmica, este perfil de espectros é comparado com o perfil de diversas espécies presentes no banco de dados e interpretados como um resultado de identificação, associado a um nível de confiança, atribuído a uma cor (Quadro 7). Resultados com identificações menores e/ou iguais a 70% não são considerados confiáveis.

Quadro 7 - Intervalos de confiança de acordo com a coloração indicada pelo fabricante.

Intervalo de confiança	Descrição	Cor
99,9%	Alta probabilidade de identificação da espécie	Verde escuro
99,8 – 90,0%	Segura identificação de gênero, provável identificação da espécie	Verde claro
89,9 – 85%	Provável identificação do gênero	Amarelo
84,9 – 70%	Baixa identificação	Branco
≤70.0%	Sem identificação confiável	Vermelho

Fonte: Adaptado do Manual MALDI-TOF/MS® (BIOMERIEUX, 2019).

O aperfeiçoamento da técnica com o uso de uma matriz que permitisse a ionização de proteínas ribossômicas – mais conservadas que as de superfície, por exemplo, favoreceu o estabelecimento de perfis de espectros característicos que conduziram à identificação de espécies e subespécies (PAVLOVIC *et al.*, 2013).

Além da utilização da técnica de MALDI-TOF/MS na caracterização de bactérias, alguns autores (DHIMAN *et al.*, 2011) citam o uso da técnica na identificação de fungos e até de vírus (SUN *et al.*, 2011) na clínica médica e animal.

Seu uso tem sido considerado de excelente desempenho (DENG *et al.*, 2014), inclusive quando comparado aos métodos utilizados rotineiramente na identificação clínica, como kits bioquímicos (GUO *et al.*, 2014). Em amostras ambientais, o uso de MALDI-TOF/MS pode ser aplicado, mas o banco de dados associado é citado como crítico na identificação dos microrganismos (MEDEIROS, 2015).

Rahi e colaboradores (2016) citam o banco de dados como limitação da técnica já que o número limitado de organismos que não sejam de interesse clínico, resulta em baixa porcentagem de identificação (43 a 65%) para microrganismos isolados do solo, água e outros ambientes.

A segurança alimentar, ao longo dos anos, ganhou considerável importância mundial, razão pela qual métodos rápidos e sistemas confiáveis para detectar a contaminação de produtos com *L. monocytogenes* e outros patógenos são continuamente procurados pela indústria alimentícia (JADHAV *et al.*, 2014).

Chen e colaboradores (2017) utilizaram diferentes metodologias tradicionais e novas, incluindo MALDI-TOF/MS, na identificação de *L. monocytogenes* em amostras de origem alimentar, obtendo resultados com sucesso e rapidez. A técnica de MALDI-TOF/MS também foi utilizada por Santos e colaboradores (2016) no estudo de estirpes de *Listeria* sp. de origem ambiental.

Uma das principais vantagens do uso desta tecnologia é o tempo para obtenção dos resultados, que é reduzido de 1 a 6 dias a menos de uma hora. Além disso, MALDI-TOF/MS permitiu a identificação precisa de uma grande variedade de bactérias de origem alimentar e ambiental (RODRIGUES *et al.*, 2017). A utilização da técnica foi apontada como vantagem significativa por Rodríguez-Sánchez e colaboradores (2019) na determinação dos padrões de suscetibilidade antimicrobiana produzindo resultados confiáveis, classificando o MALDI-TOF/MS como uma excelente ferramenta no monitoramento epidemiológico de patógenos altamente resistentes.

Nos últimos anos, o uso relativamente simples do MALDI-TOF/MS mudou o fluxo de trabalho dos laboratórios na identificação microbiana. Andrade *et al.* (2018) avaliaram a adequação da técnica para identificação de bactérias isoladas do ambiente de salas limpas em uma indústria farmacêutica e consideraram o desempenho do método confiável.

Em 2019 foi realizada uma revisão bibliográfica dos anos de 2009 a 2018 constatando que a rápida identificação dos microrganismos através do MALDI-TOF/MS permitiu a otimização do tratamento do paciente, proporcionando o início rápido e correto do mesmo, diminuindo assim, o tempo de permanência hospitalar e o custo por paciente com impacto positivo na higiene hospitalar e na saúde pública (RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2019).

O uso do MALDI-TOF/MS na rotina clínica tem um potencial significativo devido ao alto grau de precisão, além do aspecto econômico de custo-benefício. A técnica permite a rápida identificação de patógenos através dos fluidos biológicos, aliado a identificação e características de resistência a antibióticos (HOU *et al.*, 2019).

3 JUSTIFICATIVA

A contaminação por *L. monocytogenes* nas indústrias alimentícias é considerada um grave problema na área de segurança alimentar. Uma vez estabelecida no ambiente de processamento de alimentos, é muito difícil realizar o controle deste microrganismo e, mais ainda a sua eliminação do ambiente, devido ao fato do gênero ser capaz de formar biofilme e apresentar características de resistência a variações de temperatura, pH e a sanitizantes.

Embora *L. monocytogenes* seja um microrganismo bastante estudado em países desenvolvidos, no Brasil há carência de informações sobre este importante patógeno responsável por altas taxas de letalidade. Os dados no nosso país são extremamente difusos e incipientes, com raras investigações sobre o monitoramento de casos de listeriose com o agente etiológico ligado ao consumo de alimentos.

Atualmente um dos maiores desafios para os microbiologistas é a ausência de um método eficaz para distinguir as espécies com perfil atípico de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, uma vez que fenotipicamente as espécies são muito semelhantes, levando a possíveis equívocos na identificação.

Apesar de *L. innocua* não apresentar o arcabouço de genes de virulência completo, o que não a classifica como patogênica, a sua presença pode mascarar a presença de *L. monocytogenes* no ambiente ou alimento, sendo considerada um indicador importante, ressaltando a necessidade de caracterizar o isolado atípico tanto fenotipicamente como geneticamente. Uma vez identificado erroneamente um patógeno passa a ser subdiagnosticado podendo levar a ocorrência de óbitos.

Com base em relatos da literatura sobre a existência de cepas atípicas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* surgiu interesse em encontrar um método eficaz para identificar cepas pertencentes a CLIST inicialmente identificadas como *L. innocua* não tipáveis por não expressarem a hemolisina e não aglutinarem nos antissoros específicos a espécie *L. innocua*.

Diante do exposto, este projeto teve como objetivo analisar cepas do gênero *Listeria* com perfil de identificação atípico, pertencentes ao acervo da Coleção de *Listeria* do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, isoladas de diferentes fontes alimentares e oriundas de diversas regiões do país, comparando as metodologias de identificação desse microrganismo. O conjunto de

informações poderá resultar em subsídios sobre as metodologias aplicadas na detecção e correta identificação de *L. monocytogenes* veiculada nos alimentos, evitando assim erros de identificação e subdiagnóstico deste importante patógeno em nosso país.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial das técnicas tradicionais, automatizadas e moleculares na identificação das espécies de *Listeria* spp atípicas pertencentes ao acervo da Coleção de *Listeria* (CLIST) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

4.2 Objetivos específicos

- Confirmar a identificação dos isolados através das técnicas de bioquímica clássica e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).
- Comparar as metodologias automatizadas, VITEK 2 Compact® e MALDI-TOF/MS (*Matrix Assisted Lazer Desorption/Ionization – Time of Flight/Mass Spectrometry*) na identificação de cepas atípicas de *Listeria* spp.

5 METODOLOGIA

5.1 Origem dos isolados

Foram selecionadas 94 amostras do gênero *Listeria* com perfil atípico (hemólise e sorologia negativas para *L. innocua*) previamente classificadas como *L. innocua* não tipáveis. Todas as amostras são de origem alimentar e oriundas de diferentes regiões do país (Quadro 8). O critério de seleção destas amostras foi o perfil atípico e a dificuldade de identificação.

As amostras pertencem ao acervo da Coleção de *Listeria* (CLIST) do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/Fiocruz e estão criopreservadas em Caldo BHI (Brain heart infusion) (Oxoid) acrescido de 20% de glicerol e mantidas a -20°C. Para reativação das mesmas, estas foram descongeladas e semeadas em Caldo Triptosado (Oxoid) por 24 horas a 37°C. Para isolamento e verificação da viabilidade foi utilizado Agar Sangue de carneiro a 5% e Agar Triptosado (Oxoid) com mesmo período de incubação e temperatura.

As amostras reativadas encontram-se distribuídas de acordo com ano e região do país e são predominantemente oriundas da região Sul, totalizando 44 (46%), seguidas de 26 (29%) da região Sudeste, 23 (24%) da região Centro-oeste e 1 (%) da região Nordeste. O período de isolamento das amostras estudadas compreendeu a faixa de 1997 a 2009, sendo o ano de 2006 representante do maior número de isolados.

Quadro 8 - Distribuição das amostras analisadas por estado, fonte e ano de isolamento (Continua).

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
929	1997	RJ	Carne de frango congelada
966	1997	RJ	Carne de frango congelada
967	1997	RJ	Carne de frango congelada
973	1997	RJ	Carne de frango congelada
975	1997	RJ	Carne de frango congelada
1628	2004	MT	Carne cozida congelada
1629	2004	MT	Carne cozida congelada
1634	2004	MT	Carne cozida congelada
1635	2004	MT	Filé Mignon
2201	2005	RS	Swab alimento
2207	2005	RS	Swab alimento
2212	2005	RS	Swab alimento
2362	2005	SP	Carne suína
2363	2005	SP	Carne suína
2364	2005	SP	Carne suína
2380	2005	RJ	Ricota
2381	2005	RJ	Ricota
2382	2005	RJ	Ricota
2384	2005	RJ	Ricota

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
2989	2006	RS	Frango refrigerado
2990	2006	RS	Frango refrigerado
2991	2006	RS	Frango refrigerado
2992	2006	RS	Frango refrigerado
2993	2006	RS	Frango refrigerado
2994	2006	RS	Frango refrigerado
2995	2006	RS	Frango refrigerado
2996	2006	RS	Frango refrigerado
2997	2006	RS	Frango refrigerado
2998	2006	RS	Frango refrigerado
2999	2006	RS	Frango refrigerado
3000	2006	RS	Frango refrigerado
3001	2006	RS	Frango refrigerado
3002	2006	RS	Frango refrigerado
3003	2006	RS	Frango refrigerado
3004	2006	RS	Frango refrigerado
3068	2006	MT	Carne cozida congelada
3218	2006	RS	Cortes de frango resfriado
3219	2006	RS	Cortes de frango resfriado

Quadro 8 - Distribuição das amostras analisadas por estado, fonte e ano de isolamento (Continuação).

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
2384	2005	RJ	Ricota
2387	2005	RJ	Ricota
2450	2005	SP	Carne bovina
2460	2005	SP	Carne bovina
4668	2006	RJ	Carne moída bovina
4669	2006	MT	Swab alimento
4670	2006	MT	Swab alimento
4671	2006	SC	Carne suína
4672	2006	SC	Carne de aves
4673	2006	SC	Carne bovina
4674	2006	SC	Carne bovina
4675	2006	SC	Carne suína
4677	2006	SC	Carne suína
4678	2006	RJ	Carne moída bovina
4679	2006	SC	Carne de aves
4670	2006	SC	Carne de aves
4681	2006	SC	Carne suína

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
3219	2006	RS	Cortes de frango resfriado
3227	2006	RS	Cortes de frango resfriado
3228	2006	RS	Cortes de frango resfriado
3229	2006	RS	Cortes de frango resfriado
3230	2006	RS	Cortes de frango resfriado
2512	2006	SP	Musculo bovino congelado
2513	2006	SP	Dianteiro bovino
4692	2007	MG	Queijo industrializado
4693	2007	MT	Swab alimento
AL098	2007	MT	Swab alimento
AL099	2007	MT	Swab alimento
AL190	2007	MT	Swab alimento
AL227	2007	SP	Costela suína
2402	2008	GO	Alimento
2403	2008	GO	Swab alimento
2428	2008	GO	Swab alimento
AL384	2008	SP	Salsicha

Quadro 8 - Distribuição das amostras analisadas por estado, fonte e ano de isolamento (Concluído).

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
4682	2006	MT	Swab alimento
4683	2006	SC	Carne suína
4684	2006	SC	Carne suína
4685	2006	RJ	Carne moída bovina
4686	2006	RJ	Carne moída bovina
4687	2006	SC	Carne de aves
4688	2006	SC	Carne suína
4689	2006	SC	Carne de aves
4690	2006	SC	Carne suína
4691	2006	SC	Pratos prontos
2987	2006	RS	Frango refrigerado
2988	2006	RS	Frango refrigerado

CLIST	Ano	Estado	Fonte de isolamento
AL385	2008	SP	Tiras de frango
AL386	2008	SP	Tiras de frango
AL603	2008	BA	Linguixa
AL257	2008	MT	Alimento
AL259	2008	MT	Alimento
AL261	2008	MT	Alimento
AL263	2008	MT	Alimento
AL267	2008	MT	Alimento
AL269	2008	MT	Alimento
AL271	2008	MT	Alimento
AL275	2008	MT	Alimento
4694	2009	SP	Escarola
4695	2009	RS	Carcaça

5.2 Identificação bioquímica e caracterização antigênica

Para realização dos testes bioquímicos e antigênicos, as amostras foram semeadas em Agar Triptosado inclinado para obtenção de crescimento bacteriano (24h/37°C). A identificação em nível de espécie foi realizada a partir da fermentação de açúcares (D-dextrose, D-xilose, D-manitol, D-ramnose e Alfa D- Manosideo),

motilidade a 25°C, teste de catalase e ação hemolítica em Agar Sangue de carneiro a 5%, de acordo com os processos descritos por Rocourt *et al.* (1983).

A análise antigênica para identificação de sorogrupos/sorotipos foi realizada previamente, por meio da técnica de aglutinação rápida em lâmina, utilizando os antissoros policlonais somáticos e flagelares, polivalentes e monovalentes, produzidos pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas, de acordo com as recomendações de Seeliger & Höhne (1979).

5.3 Identificação bioquímica automatizada (VITEK 2 Compact® - BioMeriëux)

Para a identificação dos isolados foram utilizados cartões para Gram-positivos (GP). A partir de colônias puras e frescas (24 horas), isoladas em Agar Sangue de carneiro a 5%, foi preparada uma suspensão bacteriana em um tubo descartável de acrílico contendo 3 mL de solução salina estéril a 0,85% (Air Life™ Sodium Chloride Inhalation Solution – Care Fusion). Todas as suspensões bacterianas foram diluídas a uma faixa de turvação preconizada pelo fabricante para utilização do cartão GP (0,5 a 0,63 padrão McFarland) e verificadas com auxílio do aparelho *DensiCheckplus*, segundo instruções do fabricante.

Cada tubo com a suspensão preparada foi colocado em uma das dez posições disponíveis de um cassete plástico e uma lista foi elaborada, com a posição das amostras em cada cassete, discriminando o número da cepa e o número do cassete. A suspensão foi associada a uma carta GP, o capilar acoplado à carta foi introduzido no tubo de acrílico correspondente e os pares formados (suspensão e carta) foram introduzidos no equipamento (câmara de vácuo e câmara de carregamento) e a partir deste ponto o processamento foi realizado pelo VITEK 2 Compact®.

A partir das listas geradas, foi realizado o cadastro das amostras no computador, através do software “VITEK 2 SYSTEM”. Após o período de incubação (variável para cada estirpe analisada, podendo chegar a 24 horas), os resultados foram obtidos através do mesmo software e analisados com nível de confiança de acordo com tabela fornecida pelo fabricante.

As amostras padrão *L. monocytogenes* 1/2a (ATCC 15313, CDC F4561, 10403S), *L. monocytogenes* 1/2b (ATCC BAA-751), *L. monocytogenes* 3b (CDC

F4540), *L. monocytogenes* 3c (CDC F6238), *L. monocytogenes* 4a (ATCC 19114), *L. monocytogenes* 4ab (CDC F1067), *L. monocytogenes* 4b (ATCC 7644, Scott A), *L. monocytogenes* 4c (ATCC 19116), *L. monocytogenes* 4d (ATCC 19117), *L. monocytogenes* 4e (ATCC 19118), *L. seeligeri* (CLIP 9529), *L. welshimeri* (CDC F4082), *L. innocua* (CLIP 12570, CLIP 12595, CLIP 12612, CLIP 12624, CDC F4078) e *L. grayi* (CDC F4076) foram utilizadas como controle do método (Quadro 9).

5.4 Avaliação da produção da fosfolipase C (PI-PLC)

Para avaliar a atividade da produção da fosfolipase C (PI-PLC) todas as cepas foram semeadas no meio Agar *Listeria* acc. Ottaviani & Agosti[®] - ALOA (Sigma-Aldrich) e incubadas por 24h-72h/ 37°C (ISO 11290-1:2017 :2017).

5.5 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF/MS – BioMérieux[®]

Os isolados foram ativados em Agar Sangue de carneiro a 5% (Biocen) a 37°C por 24/48 horas, sendo transferidos para um poço (*spot*) de uma lâmina (*slide*) do modelo Flexi-Mass-DS TO-430 (BioMérieux). Com auxílio de uma micropipeta, 1 µL de solução da matriz de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (VITEK MS - CHCA, BioMérieux) foi aplicado sobre cada esfregaço. Foram realizadas duas replicatas por amostra e nos *spots* centrais de cada *slide* utilizado, foram realizados esfregaços da cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 (cepa utilizada no controle de qualidade da análise e como calibrador do equipamento), que também foram cobertos com 1 µL de solução matriz CHCA.

Foi realizada a inclusão de um *spot* (sem amostra) com matriz CHCA para controle negativo e a utilização das cepas de referência *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) na primeira fileira (A1 ao A4) para controle positivo do teste e avaliação, quando necessário, de um novo ajuste fino do equipamento.

As estirpes submetidas ao sistema VITEK MS RUO foram cadastradas no sistema, utilizando o *software* SARAMIS TargetManager (database version 1.12 e

system version 3.5.1.3; 2010).

Após a cristalização da matriz, os *slides* foram introduzidos no equipamento VITEK MS RUO (MALDI-TOF/MS, modelo AXIMA, Kratos/Shimadzu), equipado com um laser de nitrogênio que opera a 337 nanômetros (nm) e cada amostra foi submetida a vários disparos de laser.

Os resultados obtidos foram analisados pelo *software* SARAMIS Premium (Database version 4.10 e System version 4.0.0.4, 2010) e expressos como uma série de picos (espectros), que foram interpretados pelo *software* SARAMIS para fornecer um resultado de identificação associado a um nível de confiança.

Como controle do método foram utilizadas as amostras padrão do gênero *Listeria* descritas no quadro 9.

Quadro 9 - Lista de amostras padrão utilizadas como controles nos ensaios de MALDI TOF/MS e Vitek® 2.

Amostra	Amostra
<i>L. grayi</i> CDC F4076	<i>L. monocytogenes</i> 3b CDC F4540
<i>L. innocua</i> CLIP 12570	<i>L. monocytogenes</i> 3c CDC F6238
<i>L. innocua</i> CLIP 12595	<i>L. monocytogenes</i> 4a ATCC 19114
<i>L. innocua</i> CLIP 12612	<i>L. monocytogenes</i> 4ab CDC F1067
<i>L. innocua</i> CLIP 12624	<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 7644
<i>L. innocua</i> CDC F4078	<i>L. monocytogenes</i> 4b Scott A
<i>L. ivanovii</i> CLIP 7842	<i>L. monocytogenes</i> 4c ATCC 19116
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a CDC F4561	<i>L. monocytogenes</i> 4d ATCC 19117
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a ATCC 15313	<i>L. monocytogenes</i> 4e ATCC 19118
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a 10403S	<i>L. seeligeri</i> CLIP 9529
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b ATCC BAA-751	<i>L. welshimeri</i> CDC F4082

5.6 Identificação e Caracterização Molecular

5.6.1 Extração de DNA

As amostras foram repicadas em tubos com ágar triptosado inclinado e incubadas por 18-24h a 37°C para obtenção de crescimento bacteriano. Foi realizada uma suspensão bacteriana em solução salina a 0,85%, a qual foi posteriormente centrifugada a 25,000 g durante 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado. A partir do crescimento, o DNA total foi extraído com o auxílio do Kit DNeasy Blood & Tissue® (QIAGEN) seguindo as orientações do fabricante. O DNA extraído foi acondicionado a -20°C.

5.6.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A confirmação de gênero e espécie foi realizada com dois iniciadores, um para o gene da subunidade 23S do RNA ribossomal e outro para o gene *hly*, que codifica a listeriolisina O (LLO), segundo Hudson *et al.*, (2001). Para confirmação das espécies *L. innocua* e *L. grayi* foram utilizados os iniciadores in9 e lgr, respectivamente, de acordo com Tao *et al.*, 2017. E, segundo Liu *et al.*, 2004 foi utilizado o iniciador lwe7-571 para confirmação da espécie *L. welshimeri*.

A sorotipagem molecular das amostras de *L. monocytogenes* foi realizada utilizando os iniciadores segundo Doumith *et al.*, (2004). No Quadro 10 estão descritos todos os iniciadores utilizados. As amostras padrão de *L. monocytogenes* ATCC 19111 (sorotipo 1/2a), CDC F4976 (1/2b), CDC F6254 (1/2c), CDC F4555 (4b), CDC F4076 (*L. grayi*), CLIP 12612 (*L. innocua*) e CDC F4082 (*L. welshimeri*) foram incluídas como controle para todas as reações de PCR, de acordo com a espécie.

No preparo da reação, para cada tubo de amostra, foram utilizados tampão de reação (1X), solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) 2 mM, solução de dNTPs (0,2 mM de cada nucleotídeo), iniciadores (10 pmol/μL para 23S e *hly*; 1pmol/μL para sorotipos), 1U/μl de Taq DNA Polimerase e água deionizada estéril para completar o volume final 24 μL. Depois de homogeneizado, esse mix de reagentes foi vertido em tubos de 200 μL e, adicionado 1 μL do DNA genômico de cada amostra (uma amostra por tubo) totalizando volume final de 25 μL. Os reagentes utilizados foram da marca

Promega (Promega, EUA). Todas as reações de amplificação foram realizadas em termociclador modelo MG96G (Long Gene, China).

A reação multiplex com os iniciadores 23S e *hly* utilizou o seguinte programa: 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação de 95°C por 1 minuto, uma etapa de anelamento de 62°C por 1 minuto e uma etapa de extensão de 72°C por 1 minuto, seguidos por uma etapa final de 72°C por 8 minutos (HUDSON *et al.*, 2001). Esse mesmo ciclo foi utilizado para reação multiplex com os iniciadores *in9*, *lgr* e *lwe7-571* (TAO *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2004).

Para o multiplex de sorotipagem molecular foram utilizados 35 ciclos compostos por uma etapa de desnaturação de 94°C por 40 segundos, uma etapa de anelamento de 53°C por 1 minuto e 15 segundos, uma etapa de extensão de 72°C por 1 minuto e 15 segundos, seguidos por uma etapa final de 72°C por 7 minutos (DOUMITH *et al.*, 2004).

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% para 23S, *hly*, *in9*, *lgr* e *lwe7-571* por 50 minutos a 100 V e 2% por 80 minutos a 100 V para o multiplex de sorotipagem, com tampão de corrida TBE 0,5X (Tris-base (45 mM), ácido bórico (45 mM) e EDTA (1 mM), pH 8 - Bio-Rad, EUA). Os géis foram corados com solução de brometo de etídio (500 mL de água deionizada + 50 µL EtBr (10 µg/µL) por 15 minutos e visualizados em transiluminador de UV acoplado a um sistema digital de imagem em gel.

Quadro 10 - Sequência de nucleotídeos dos iniciadores utilizados neste estudo.

Iniciador	Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb*)	Alvo	Referência
23S rRNA	F: GGGGAACCCACTATCTTTAGTC R: GGGCCTTTCCAGACCGCTTCA	239	Gênero <i>Listeria</i>	Hudson <i>et al.</i> , 2001
<i>hly</i>	F:GCCTGCAAGTCCTAAGACGCCAAC R:CTTGCAACTGCTCTTTAGTAACAC	706	Listeriolisina O	Hudson <i>et al.</i> , 2001
<i>Lgr</i>	F: GCGGATAAAGGTGTTCCGGGTCAA R: ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG	201	<i>L. grayi</i>	Tao <i>et al.</i> , 2017
<i>in9</i>	F: GGCTTCAGCGATTCTTCCG R: GCCCGATTTCTCACTGTCTAA	421	<i>L. innocua</i>	Tao <i>et al.</i> , 2017
<i>lwe7-571</i>	F: TCCCACCATTGGTGCTACTCA R: TTGGCGTACCAAAGAAATACG	608	<i>L. welshimeri</i>	Liu <i>et al.</i> , 2004
<i>lmo0737</i>	F: AGGGCTTCAAGGACTTACCC R: ACGATTTCTGCTTGCCCATTC	691	Sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c	Doumith <i>et al.</i> , 2004
<i>lmo1118</i>	F: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA R: CGGCTTGTTCCGGCATACTTA	906	Sorotipos 1/2c e 3c	Doumith <i>et al.</i> , 2004
ORF2819	F: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT R: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471	Sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e	Doumith <i>et al.</i> , 2004
ORF2110	F: AGTGGACAATTGATTGGTGAA R: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597	Sorotipos 4b, 4d e 4e	Doumith <i>et al.</i> , 2004

*pb: pares de base.

F: forward.

R: reverse.

5.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio da avaliação da sensibilidade, especificidade e a acurácia dos sistemas de identificação utilizados neste estudo, calculadas de acordo com Greenhalgh (1997) e determinadas comparando os resultados obtidos no sistema semi-automatizado Vitek® 2 e no MALDI-TOF/MS, com os resultados obtidos pela técnica de PCR (DOUMITH *et al.*, 2004) considerados como padrão-ouro. A acurácia de um teste de diagnóstico responde como este teste discrimina corretamente uma espécie (BORGES, 2016). Esta capacidade discriminativa pode ser quantificada por meio da sensibilidade e especificidade que, de acordo com Borges (2016), sensibilidade é a capacidade que o teste de diagnóstico apresenta de detectar os verdadeiramente positivos e especificidade é a capacidade de detectar os verdadeiros negativos.

Os cálculos foram realizados por meio de uma tabela 2x2, com os grupos de espécies divididos de acordo com o padrão-ouro (ou do método de referência) em colunas e, categorias de acordo com o resultado do teste (Tabela 1).

Tabela 1 - Modelo de tabela 2X2 para cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia.

	Resultado do teste padrão ouro	
Resultado do método teste	Resultado positivo (a+c)	Resultado Negativo (b+d)
Teste positivo (a+b)	Verdadeiro positivo (a)	Falso positivo (b)
Teste negativo (c+d)	Falso negativo (c)	Verdadeiro negativo (d)

Segundo Greenhalgh (1997), a sensibilidade, especificidade e acurácia são expressos em porcentagem e calculados de acordo com a tabela 2.

Tabela 2 – Modelo para cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia

Sensibilidade	$a/(a+c)$
Especificidade	$d/(b+d)$
Acurácia	$(a+d)/(a+b+c+d)$

6 RESULTADOS

6.1 Identificação bioquímica convencional

A identificação bioquímica das amostras foi realizada através de testes fenotípicos a partir da fermentação dos carboidratos, pesquisa de catalase, mobilidade a 25°C e hemólise em Agar Sangue de carneiro a 5% de acordo com a metodologia ISO 11290-1:2017. *L. monocytogenes* e *L. innocua* apresentam perfis bioquímicos semelhante e, estes foram mantidos após o período de preservação na CLIST, com exceção de 1 cepa que apresentou D-manitol positivo e foi identificada como *L. grayi* (Figura 4).

Em substituição a sorologia convencional, devido a indisponibilidade dos antissoros produzidos pelo LABZOO, utilizamos a PCR multiplex elaborada por Doumith *et al.* (2004) com o objetivo de confirmar a análise antigênica convencional das amostras estudadas neste trabalho.

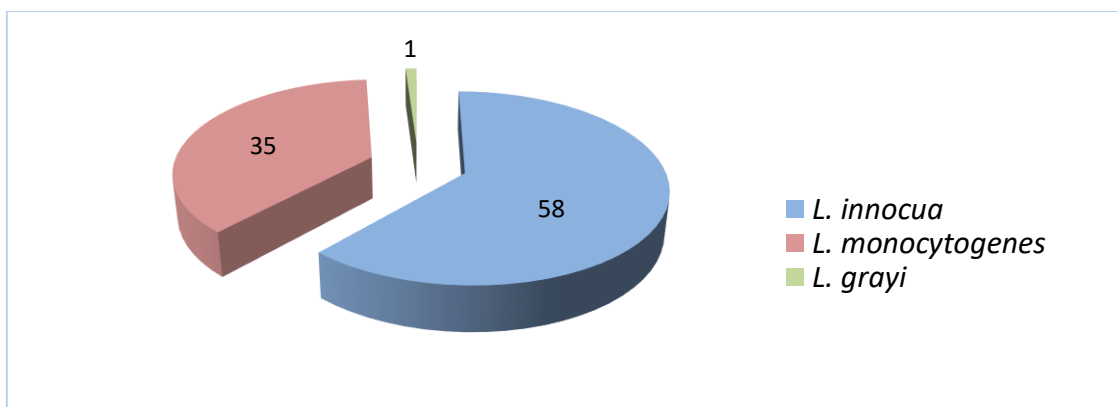


Figura 4 - Identificação bioquímica convencional (ISO 11290-1:2017 :2017).

6.2 Identificação e caracterização molecular

As amostras foram submetidas a PCR confirmatório para gênero utilizando os iniciadores para o gene da subunidade 23S do RNA ribossomal e outro para a espécie *L. monocytogenes*, o gene *hly* que codifica a listeriolisina O.

Todas as amostras revelaram resultado positivo para o gene 23S, o que confirma 100% das amostras pertencentes ao gênero *Listeria* (Figura 5).

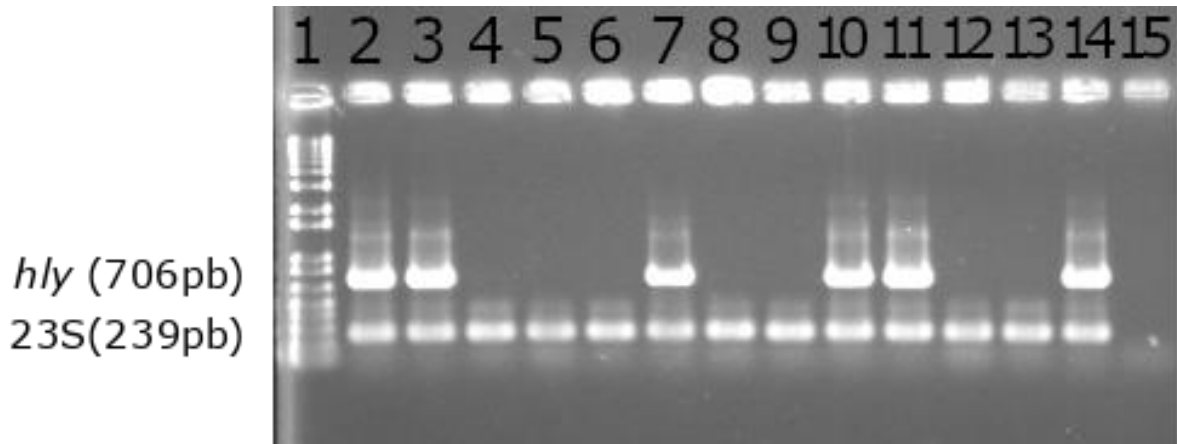


Figura 5 - Gel representativo da PCR multiplex com os iniciadores 23S e *hly*

Amostras: (1) Peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), (2) CDC F4555 (*L. monocytogenes* 4b), (3 até 14) amostras utilizadas neste estudo, (15) controle negativo.

A bioquímica convencional, considerada pela ISO 11290-1:2017 como metodologia padronizada, foi compilada ao resultado da PCR e apontada como “padrão ouro” pelo LABZOO. Desta forma, 54 amostras positivas para o gene *hly* foram identificadas como *L. monocytogenes*.

Das 40 amostras negativas para *hly*, 31 foram identificadas como *L. innocua*, 8 como *L. welshimeri* e 1 como *L. grayi* (Figura 6).

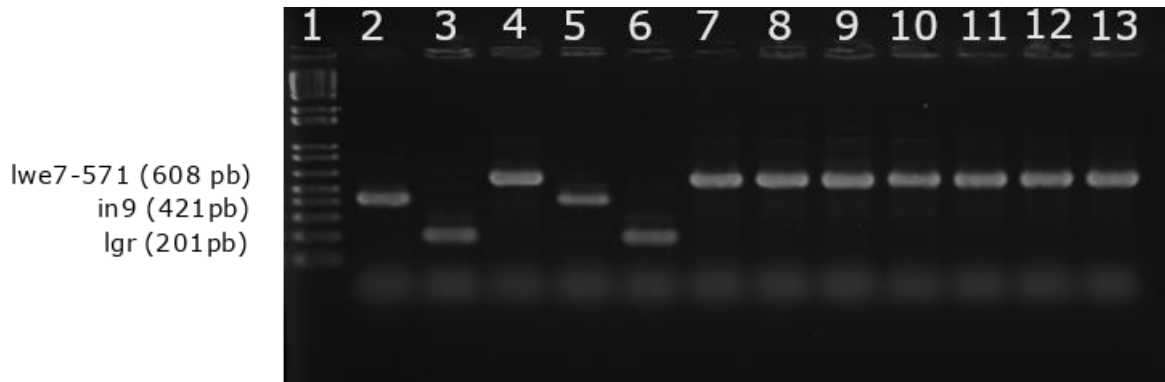


Figura 6 - Gel representativo da confirmação das espécies através da PCR multiplex com os iniciadores in9, lgr e lwe7-571.

Amostras: (1) Peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), (2) CLIP 12612 (*L. innocua*), (3) CDC F4076 (*L. grayi*), (4) CDC F4082 (*L. welshimeri*), (5- 13) amostras utilizadas neste estudo.

A PCR para os sorotipos de *L. monocytogenes*, identificou o sorotipo 1/2a como predominante, sendo encontrado em 44 amostras, seguido do sorotipo 1/2c e 4b encontrado em 4 amostras cada e, do sorotipo 1/2b em 2 amostras (Figura 7).

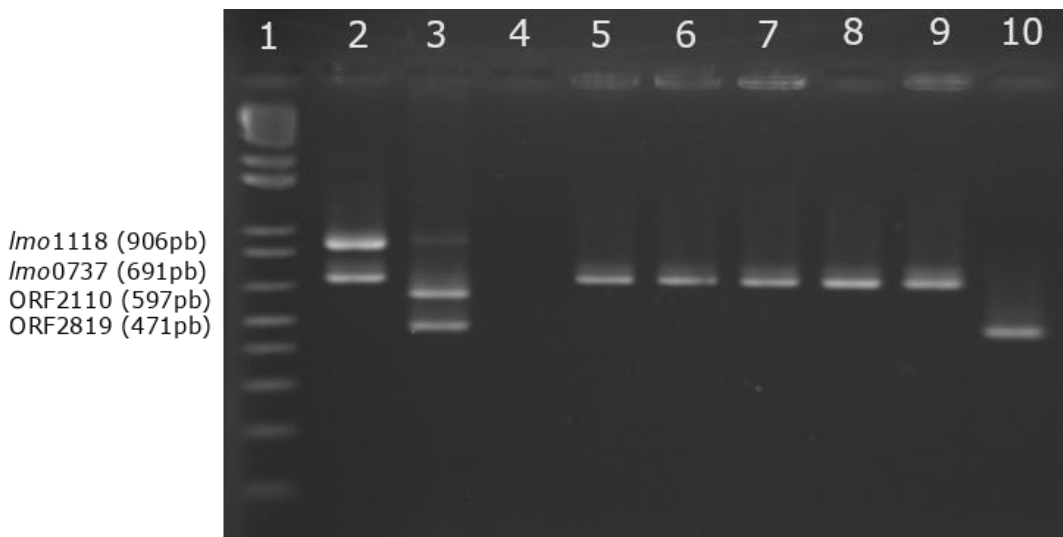


Figura 7 - Gel representativo da PCR multiplex com os iniciadores lmo0737, lmo1118, ORF2110 e ORF2819.

Amostras: (1) Peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen), (2) CDC F6254 (*L. monocytogenes* 1/2c), (3) CDC F4555 (*L. monocytogenes* 4b), (4) controle negativo, (5 -10) amostras utilizadas neste estudo.

6.3 Identificação proteômica e bioquímica automatizada das amostras padrão

O VITEK® 2 identificou as amostras *L. innocua*, *L. grayi*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri* com percentual acima de 90%. Quanto a espécie *L. monocytogenes*, o equipamento não foi capaz de identificar corretamente os sorotipos 3b (*L. monocytogenes* 3b CDC F4540), 4a (*L. monocytogenes* 4a ATCC 19114), 4b (*L. monocytogenes* 4b ATCC 7644) e 4d (*L. monocytogenes* 4d ATCC 19117).

Em relação ao MALDI-TOF/MS, o método identificou corretamente todos os sorotipos da espécie *L. monocytogenes* e a espécie *L. grayi*. Por outro lado, o equipamento não foi capaz de identificar nenhuma cepa de *L. innocua*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri*, classificando-as com *Listeria sp.* (Tabela 3).

Tabela 3 – Identificação proteômica e bioquímica automatizada das amostras padrão.

Amostra	VITEK® 2	MALDI-TOF/MS
<i>L. grayi</i> CDC F4076	<i>L. grayi</i> 95%	<i>Listeria grayi</i> 99,90%
<i>L. innocua</i> CLIP 12570	<i>L. innocua</i> 99%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. innocua</i> CLIP 12595	<i>L. innocua</i> 99%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. innocua</i> CLIP 12612	<i>L. innocua</i> 98%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. innocua</i> CLIP 12624	<i>L. innocua</i> 98%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. innocua</i> CDC F4078	<i>L. innocua</i> 98%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. ivanovii</i> CLIP 7842	<i>L. ivanovii</i> 98%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a CDC F4561	<i>L. monocytogenes</i> 96%	<i>L. monocytogenes</i> 84,20%
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a ATCC 15313	<i>L. monocytogenes</i> 99%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a 10403S	<i>L. monocytogenes</i> 99%	<i>L. monocytogenes</i> 90%
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b ATCC BAA-751	<i>L. monocytogenes</i> 91%	<i>L. monocytogenes</i> 99,90%
<i>L. monocytogenes</i> 3b CDC F4540	<i>L. innocua</i> 49% / <i>L. mono</i> 51%	<i>L. monocytogenes</i> 91,30%
<i>L. monocytogenes</i> 3c CDC F6238	<i>L. monocytogenes</i> 94%	<i>L. monocytogenes</i> 82,80%
<i>L. monocytogenes</i> 4a ATCC 19114	<i>L. innocua</i> 49% / <i>L. mono</i> 51%	<i>L. monocytogenes</i> 90%
<i>L. monocytogenes</i> 4ab CDC F1067	<i>L. monocytogenes</i> 99%	<i>L. monocytogenes</i> 93,60%
<i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 7644	<i>L. innocua</i> 50% / <i>L. mono</i> 50%	<i>L. monocytogenes</i> 86,40%
<i>L. monocytogenes</i> 4b Scott A	<i>L. monocytogenes</i> 99%	<i>L. monocytogenes</i> 93,60%
<i>L. monocytogenes</i> 4c ATCC 19116	<i>L. monocytogenes</i> 99%	<i>L. monocytogenes</i> 93,60%
<i>L. monocytogenes</i> 4d ATCC 19117	<i>L. innocua</i> 49% / <i>L. mono</i> 51%	<i>L. monocytogenes</i> 97,20%
<i>L. monocytogenes</i> 4e ATCC 19118	<i>L. monocytogenes</i> 88%	<i>L. monocytogenes</i> 90%
<i>L. seeligeri</i> CLIP 9529	<i>L. seeligeri</i> 98%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%
<i>L. welshimeri</i> CDC F4082	<i>L. welshimeri</i> 95%	<i>Listeria sp.</i> 99,90%

6.4 Identificação bioquímica automatizada (VITEK 2 Compact®)

A bioquímica automatizada foi realizada em dois momentos distintos e, de acordo com o fabricante, os resultados finais foram obtidos em aproximadamente oito horas ou menos (Tabela 4 e 5).

Tabela 4 - Identificação das amostras (1ª análise) de acordo com VITEK® 2

Espécie (ID por PCR)	Nº de amostras	ID Correta	ID Apenas Gênero	ID Incorreta
<i>L. monocytogenes</i>	54	8	4	42
<i>L. innocua</i>	31	23	7	1
<i>L. welshimeri</i>	8	6	0	2
<i>L. grayi</i>	1	1	0	0
Total	94	38	11	45

*ID: identificação

Tabela 5 - Identificação das amostras (2ª análise) de acordo com VITEK® 2

Espécie (ID por PCR)	Nº de amostras	ID Correta	ID Apenas Gênero	ID Incorreta
<i>L. monocytogenes</i>	54	10	3	41
<i>L. innocua</i>	31	26	5	0
<i>L. welshimeri</i>	8	8	0	0
<i>L. grayi</i>	1	1	0	0
Total	94	45	8	41

*ID: identificação

O equipamento não foi capaz de identificar, ao nível de espécie, 11 amostras na primeira análise e 08 amostras na segunda análise, classificando-as como baixa discriminação mostrando um resultado duvidoso entre duas espécies, mantendo a identificação do gênero.

6.5 Avaliação da produção da fosfolipase C (PI-PLC)

Todas as 94 amostras foram testadas frente à produção da fosfolipase C e apenas 54 amostras apresentaram atividade positiva para PI-PLC (Figura 8), sendo necessário até 72 horas para resultado final. Após este período 40 amostras permaneceram negativas para PI-PLC.

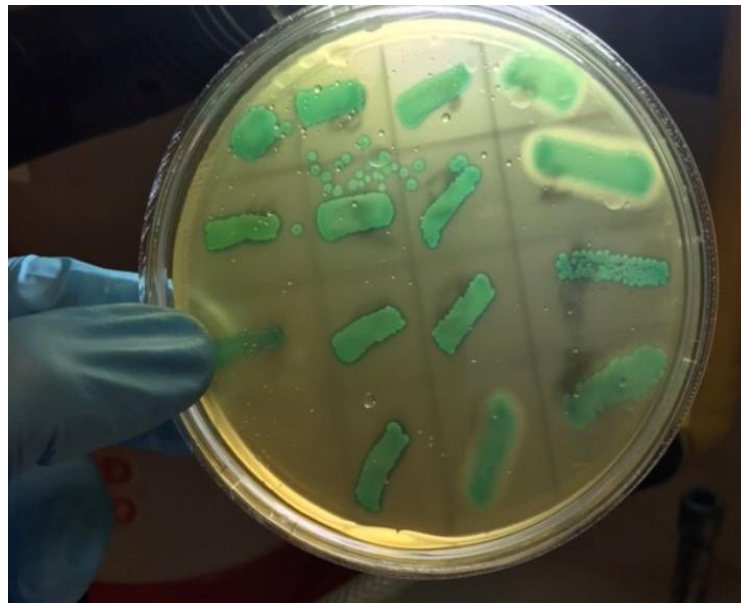


Figura 8 – Figura representativa da produção da fosfolipase C (PI-PLC) em meio ALOA.

6.6 Identificação proteômica (MALDI-TOF/MS – BioMérieux®)

Assim como a identificação bioquímica automatizada, a identificação proteômica também foi realizada em dois momentos distintos (Tabela 6 e Tabela 7).

Algumas cepas foram identificadas incorretamente como *L. monocytogenes* (1º análise: 16 e 2º análise: 21) e outras identificadas apenas ao nível de gênero (1º análise: 15 e 2º análise: 10), sendo classificadas como *Listeria* sp. pelo equipamento.

Tabela 6 - Identificação das amostras (1º análise) de acordo com MALDI-TOF/MS.

Espécie (ID por PCR)	Nº de amostras	ID Correta	ID Apenas Gênero	ID Incorreta	Sem ID
<i>L. monocytogenes</i>	54	40	14	0	0
<i>L. innocua</i>	31	0	15	16	0
<i>L. welshimeri</i>	8	0	4	0	4
<i>L. grayi</i>	1	1	0	0	0
Total	94	41	33	16	4

*ID: identificação

Tabela 7 - Identificação das amostras (2º análise) de acordo com MALDI-TOF/MS

Espécie (ID por PCR)	Nº de amostras	ID Correta	ID Apenas Gênero	ID Incorreta	Sem ID
<i>L. monocytogenes</i>	54	39	15	0	0
<i>L. innocua</i>	31	0	10	21	0
<i>L. welshimeri</i>	8	2	6	0	0
<i>L. grayi</i>	1	1	0	0	0
Total	94	42	31	21	0

*ID: identificação

6.7 Avaliação da sensibilidade, especificidade e acurácia dos sistemas de identificação

Os resultados obtidos nos testes da PCR foram considerados como padrão-ouro nesta avaliação e, os resultados de sensibilidade, especificidade e acurácia dos testes estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Cálculo de sensibilidade, especificidade e acurácia das análises realizadas por Vitek® 2 e MALDI-TOF/MS de acordo com as espécies.

Espécie (n.º total de cepas)	Parâmetros (%)	Vitek® 2		MALDI-TOF/MS	
		Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
<i>L. monocytogenes</i> (n=54)	Sensibilidade	14,8	18,5	24,1	59,3
	Especificidade	100,0	97,5	85,0	70,0
	Acurácia	51,1	52,1	50,0	63,8
<i>L. innocua</i> (n=31)	Sensibilidade	74,2	83,9	0,0	0,0
	Especificidade	30,2	34,9	100,0	100,0
	Acurácia	44,7	51,1	67,0	67,0
<i>L. welshimeri</i> (n=8)	Sensibilidade	75,0	100,0	0,0	12,5
	Especificidade	98,8	100,0	100,0	100,0
	Acurácia	96,8	100,0	91,5	92,6
<i>L. grayi</i> (n=1)	Sensibilidade	100,0	100,0	100,0	100,0
	Especificidade	100,0	100,0	100,0	100,0
	Acurácia	100,0	100,0	100,0	100,0

Analisando a espécie *L. monocytogenes*, o Vitek® 2 apresentou 14,8% de sensibilidade e, 100% de especificidade no primeiro ensaio. No segundo ensaio a sensibilidade aumentou para 18,5% enquanto a especificidade baixou para 97,5%. Por outro lado, o MALDI-TOF/MS mostrou 24,1% de sensibilidade mas, 85,0% de especificidade no primeiro ensaio e 59,3% de sensibilidade e 70,0% de especificidade no segundo ensaio (Tabela 8).

O MALDI-TOF/MS mostrou 100% de especificidade nos dois ensaios da espécie *L. innocua*, porém não apresentou sensibilidade em ambos ensaios. Por outro lado, o Vitek® 2 apresentou 74,2% e 83,9% de sensibilidade respectivamente no primeiro e segundo ensaios, enquanto a especificidade no primeiro ensaio foi 30,2% e no segundo 34,9% (Tabela 8).

Para a espécie *L. grayi*, as duas metodologias testadas apresentaram 100% de sensibilidade, especificidade e acurácia em ambos ensaios, no entanto como apenas uma cepa foi utilizada, mais testes serão necessários para avaliação destes parâmetros na identificação da referida espécie. O mesmo foi observado no segundo ensaio do Vitek® 2 para a espécie *L. welshimeri*, diferenciando-se do primeiro ensaio onde a sensibilidade foi de 75,0% e a especificidade 98,8%. Na análise do MALDI-TOF/MS os dois ensaios apresentaram 100% de especificidade. Contudo, a sensibilidade no primeiro ensaio foi de 0%, e no segundo ensaio apresentou um ligeiro aumento de 12,5% (Tabela 8).

7 DISCUSSÃO

Embora *L. innocua* não apresente patogenicidade para o homem, Perrin e colaboradores (2003) relataram o primeiro caso de uma bacteremia envolvendo a espécie e, definem como um risco a distinção entre *L. monocytogenes* e *L. innocua* com base na atividade hemolítica. O perfil hemolítico de algumas cepas deste estudo tornou-se evidente, provavelmente devido ao período de criopreservação (Alves *et al.*, 2020). Desta forma, 35 amostras foram identificadas como *L. monocytogenes* (Figura 5) e as outras 59 amostras permaneceram sem expressão da hemolisina. A existência de cepas atípicas indica que os métodos fenotípicos e genotípicos tradicionais devem ser usados com cautela e que mais estudos e/ou metodologias são necessários para correta identificação do gênero *Listeria* (MORENO *et al.*, 2014).

O presente trabalho mostrou que a identificação bioquímica automatizada por VITEK 2 Compact® não identificou corretamente as amostras de *L. monocytogenes*. Este fato pode ser justificado pela dificuldade na expressão da hemólise e/ou na fosfolipase tardia, já que o equipamento realiza a leitura em até 24 horas e algumas amostras levaram até 72 horas para expressão da fosfolipase. Todas as amostras que apresentaram fosfolipase tardia foram identificadas, erradamente, como *L. innocua* pelo equipamento.

Nas duas análises realizadas pelo VITEK® 2, apenas a identificação da espécie *L. grayi* foi mantida e considerada correta quando comparada ao padrão-ouro. Acredita-se que a diferença encontrada na caracterização das espécies nas duas análises, mais uma vez, seja devido ao tempo de leitura do equipamento e ao fato das amostras apresentarem metabolismos diferentes.

As amostras trabalhadas neste estudo foram consideradas atípicas por não expressarem a hemolisina, principal fator de virulência do gênero *Listeria*. O gene *hly* foi detectado através da PCR e, por este motivo as amostras foram identificadas como *L. monocytogenes*. Rosimin e colaboradores (2016), em estudos realizados com alimentos confrontam nossas informações. Os autores descreveram cepas de *L. innocua* atípicas por apresentarem genes de virulência e apoiam a hipótese de Moreno *et al.* (2014) que citam a presença do gene de virulência em *L. innocua* como um estágio na evolução de um ancestral comum de *L. monocytogenes*.

Em concordância com nossos resultados, De Lappe e colaboradores (2014) citam o VITEK® 2 como uma metodologia limitante para identificação do gênero *Listeria*, visto que o método identificou erroneamente amostras clínicas e alimentares de *L. monocytogenes* como *L. innocua*. Os autores ressaltam o teste de fosfolipase negativa para estas amostras.

De acordo com “padrão ouro” definido pelo LABZOO, das 94 amostras estudadas, 54 foram positivas para o gene *hly* através da PCR e foram identificadas como *L. monocytogenes*, enquanto o VITEK® 2 identificou apenas 8 amostras como *L. monocytogenes* na primeira análise e 10 amostras na segunda análise. Os estudos realizados por Tahoun e colaboradores (2017) divergem dos nossos resultados. Os autores analisaram 79 amostras de leite e compararam a metodologia automatizada com metodologia molecular. Entre isolados, 69 (87,3%) foram confirmados como *L. monocytogenes* e 10 (12,7%) como *L. innocua*. Todos os isolados identificados como *L. monocytogenes* pelo sistema VITEK® 2 foram confirmados utilizando o ensaio da PCR.

Recentemente, em 2018, durante o maior surto de listeriose relatado na África do Sul, foram identificadas amostras de *L. monocytogenes* oriundas de alimentos e ambiente de processamento através do Vitek 2 Compact® (SMITH *et al.*, 2019).

Quanto a identificação proteômica, o MALDI-TOF/MS foi assertivo na identificação de 40 amostras de *L. monocytogenes* na primeira análise e 39 na segunda análise, entretanto não foi capaz de identificar nenhuma cepa de *L. innocua*. Este fato deve-se a existência de apenas um espectro de referência da espécie no banco de dados do equipamento. Rahi e colaboradores (2016) citam como a principal limitação da técnica a falta de espectros de referência nos bancos de dados associados. A única espécie que manteve a mesma identificação nas duas análises foi *L. grayi*. Ressalta-se que o mesmo comportamento também foi observado na identificação automatizada.

Em 2014, Guo e colaboradores obtiveram melhor desempenho na técnica de MALDI-TOF/MS quando comparada ao Vitek® 2 na identificação de bactérias de origem clínica. Os autores descreveram a técnica como rápida e de baixo custo, além de classificarem com potencial para substituir os métodos fenotípicos convencionais na identificação de isolados bacterianos comuns em laboratórios de microbiologia clínica.

Febbraro e colaboradores (2016) obtiveram melhores resultados com Vitek® 2 quando compararam as metodologias MALDI-TOF/MS e Vitek® 2 na identificação de bactérias de origem clínica. Os autores ressaltaram resultados favoráveis apenas para amostras Gram negativas e sugerem a inserção de espectros de referência no banco de dados do MALDI-TOF/MS para amostras de origem Gram positivas. Em concordância a estes resultados, Silva e colaboradores (2017) analisaram amostras Gram positivas de origem clínica e obtiveram resultados satisfatórios pelo VITEK® 2 enquanto o MALDI-TOF/MS não foi capaz de identificar todas as amostras.

Comparando as metodologias VITEK® 2 e MALDI-TOF/MS na identificação de microrganismos anaeróbicos de origem clínica, Tsukimoto e Rossi (2018) descreveram ambas as metodologias com excelente desempenho na identificação dos isolados. Os autores destacaram diferenças significativas em relação ao custo-benefício. O MALDI-TOF/MS permitiu uma economia significativa além da liberação do resultado cinco dias antes do VITEK® 2, o que pode contribuir para uma resolução clínica bem sucedida.

Neste estudo, o MALDI-TOF/MS mostrou uma especificidade de 100% para *L. innocua*, mas o método apresentou baixa sensibilidade o que representa resultado falso negativo causando agravos na saúde pública ao identificar um patógeno erradamente. Por outro lado o VITEK® 2 apresentou alta sensibilidade na identificação desta espécie.

Analisando a espécie *L. monocytogenes*, o Vitek® 2 mostrou baixa sensibilidade, apresentando resultados falso negativos para o patógeno, podendo levar a graves problemas de segurança alimentar e saúde pública. Por outro lado, o MALDI-TOF/MS mostrou maior sensibilidade a espécie, porém mostrou problemas de repetibilidade em nossas mãos, já que o método não possui um inóculo padrão.

A baixa acurácia apresentada pelos métodos neste trabalho se deve ao fato de que quando a sensibilidade do teste foi alta para uma espécie a especificidade foi baixa e vice-versa. É importante ressaltar o baixo número de amostras utilizadas neste estudo na interpretação dos resultados estatísticos.

A sensibilidade, especificidade e acurácia não puderam ser avaliadas por outro método já que todas as cepas são positivas para *Listeria sp.*, não havendo negativos verdadeiros para *Listeria*, sendo então adotadas as espécies como critério de avaliação.

Apesar dos resultados bem sucedidos relatados usando o MALDI-TOF/MS e a ampla gama de cenários em que o equipamento pode ser utilizado, segundo Rodríguez-Sánchez (2019) mais estudos são necessários para padronizar os procedimentos aplicados e confirmar a reprodutibilidade dos resultados.

8 CONCLUSÃO

A identificação de cepas atípicas no nosso trabalho mostrou a necessidade de correlacionar a PCR aos métodos de identificação automatizados utilizados.

O VITEK® 2 apresenta como um dos fatores limitantes a identificação de apenas 6 espécies do gênero *Listeria*, visto que atualmente, o gênero é composto por 19 espécies e 4 subespécies. Além disso, o equipamento realiza leitura das provas bioquímicas e enzimáticas no intervalo de 8 a 24 horas, de acordo com cartão utilizado, enquanto as linhagens atípicas apresentam um metabolismo tardio para algumas características fenotípicas avaliadas.

O MALDI-TOF/MS apresenta banco de dados limitado, necessitando da inserção de superespectros para correta identificação de cepas com perfil atípico pertencentes ao gênero *Listeria*.

A presença de espécies de *Listeria sp.*, principalmente as atípicas, na indústria de alimentos são uma grande preocupação e exigem métodos rigorosos de detecção e identificação para impedir a transmissão da listeriose através dos alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência de Notícias Internacionais Espanhola. Edição Brasil 2019. Agência EFE. Disponível em: <<https://www.efe.com/efe/brasil/sociedade/africa-do-sul-encontra-origem-de-surto-listeriose-que-ja-deixou-176-mortos/50000246-3542292>>

Acesso em: 27/04/2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução nº 12 de 02 de janeiro de 2001. ANVISA, 2001. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 27/04/2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (ANVISA). Resolução nº 331 de 23 de dezembro de 2019. ANVISA, 2019. Disponível em: <<http://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>

Acesso em: 11/01/2020.

ALMEIDA RMD, BARBOSA AV, LISBÔA RDC, SANTOS AFDM, HOFER E, VALLIM DC & HOFER CB. Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 21(3), 282-289, 2017.

ALVES Â, MAGALHÃES R, BRANDÃO TRS, PIMENTEL L, RODRÍGUEZ-ALCALÁ LM, TEIXEIRA P, FERREIRA V. Impact of exposure to cold and cold-osmotic stresses on virulence-associated characteristics of *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, 87, 103351, 2020.

AMAJOUD N, LECLERCQ A, SORIANO JM, BRACQ-DIEYE H, EL MAADOUDI M, SENHAJI NS, KOUNNOUN A, MOURA A, LECUIT M, ABRINI J. Prevalence of *Listeria* spp. and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from food products in Tetouan, Morocco. **Food Control**, 84, 436-441, 2018.

ANDRADE LDO, AWASTHI R, DUA K, DE JESUS ANDREOLI PINTO T. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of bacteria isolated from pharmaceutical clean rooms. **Interventional Medicine and Applied Science**, 10(1), 45-53, 2018.

ANDRADE RB, GEMELLI T, DALL ONDER LP, CRISTINA K, BRITO T, BARBOZA AAL, BRITO BG. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, 77(4), 741-750, 2010.

ANGELETTI S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) in clinical microbiology. **Journal of Microbiological Methods**, 138, 20-29, 2017.

ANHALT JP, FENSELAU C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 47, 219-225, 1975.

BAKA M, NORIEGA E, STAMATI I, LOGIST F, VAN IMPE JF. Critical assessment of the time-to-detection method for accurate estimation of microbial growth parameters. **Journal of Food Safety**, 35, 179–192, 2015.

BAKKER HC, WARCHOCKI S, WRIGHT EM, ALLRED AF, AHLSTROM C, MANUEL CS, STASIEWICZ MJ, BURRELL A, ROOF S, STRAWN LK, FORTES E, NIGHTINGALE KK, KEPHART D, WIEDMANN M. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64(6):1882-9, 2014.

BARBOSA AV, CERQUEIRA ADMF, RUSAK LA, DOS REIS CMF, LEAL NC, HOFER E, VALLIM DC. Characterization of epidemic clones of *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolated from humans and meat products in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 9(09): 962-969, 2015.

BENETTI TM, MONTEIRO CLB, BEUX MR, ABRAHÃO WM. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: a comparison with conventional methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(3): 791-794, 2013.

BIOMERIEUX. *Listeria monocytogenes* 2019. Disponível em: < <https://www.biomerieux.com.br/produto/solucao-vidasr>>. Acesso em: 21/04/2019.

BORGES LS. Medidas de Acurácia diagnóstica na pesquisa cardiovascular. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 29(3), 218-22, 2016.

BORUCKI MK, CALL DR. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(12): 5537-40, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-oministerio/653-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentosdta/11220-situacao-epidemiologica-dados>>. Acesso em: 05/12/2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Portaria n.5, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos laboratórios de referência nacional ou regional e normas para notificação de casos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 fev. 2006. Seção 1, p.34. 2006.

BRASIL. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, 2016.

CAMARGO AC, CASTILHO NPA, DA SILVA DAL, VALLIM DC, HOFER E, NERO LA. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 21(4), 458-462, 2015a.

CAMARGO AC, DIAS MR, COSSI MV, LANNA FGPA, CAVICCHIOLI VQ, VALLIM DC, PINTO PSA, HOFER E, NERO LA. Serotypes and Pulso types Diversity of *Listeria monocytogenes* in a Beef-Processing Environment. **Foodborne Pathogens and Disease**, 12(4): 323-6, 2015b.

CAMARGO AC, VALLIM DC, HOFER E, AUGUSTO NERO LA. Molecular serogrouping of *Listeria monocytogenes* from Brazil using PCR. **Journal of Food Protection**, 79(1), 144-147, 2016.

CARBONNELLE E, MESQUITA C, BILLE E, DAY N, DAUPHIN B, BERETTI JL, FERRONI A, GUTMANN L, NASSIF X. MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. **Clinical Biochemistry**, 44, 104-9; 2011.

CELANDRONI F, SAIVETTI S, GUEYE SA, MAZZANTINI D, LUPETTI A, SENESI S, GHELARDIE. Identification and pathogenic potential of clinical *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates. **PLOS One**, 11(3), 1-13, 2016.

Center for Disease Control and Prevention. (CDC). Investigation Update: Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado Atlanta, USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/110211/>>. Acesso em: 27/04/2019.

Center for Disease Control and Prevention. (CDC). Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Packaged Salads Produced at Springfield, Ohio Dole Processing Facility (Final Update) 2019a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/bagged-salads-01-16/index.html>>. Acesso em: 27/04/2019.

Center for Disease Control and Prevention. (CDC). Learn about *Listeria*, a germ that can contaminate food and cause an infection called listeriosis. 2019b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>> Acesso em: 19/04/2019.

CHEN JQ, REGAN P, LAKSANALAMAI P, HEALEY S, HU Z. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. **Food Science and Human Wellness**, 6(3): 97-120, 2017.

CLAYDON MA, DAVEY SN, EDWARDS-JONES V, GORDON DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, 4, 1584-1586, 1996.

CROXATTO A, PROD'HOM G, GREUB G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, 36(2): 380-407, 2012.

CRUZ CD, MARTINEZ MB, DESTRO MT. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, 19(2): 95-206, abr./jun., 2008.

DE ANDRADE RR, DA SILVA PHC, SOUZA NR, MURATA LS, GONÇALVES VSP, SANTANA AP. 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**, 44(1): 147-152, 2014.

DE LAPPE N, LEE C, O'CONNOR J, CORMICAN M. Misidentification of *Listeria monocytogenes* by the Vitek 2 System. **Journal of Clinical Microbiology**, 52(9), 3494-3495, 2014.

DE MELO ES, DE AMORIM WR, PINHEIRO REE, DO NASCIMENTO CORRÊA PG, DE CARVALHO SMR, SANTOS ARSS, BARROS DS, OLIVEIRA ETAC, MENDES CA, DE SOUSA FV. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. **PUBVET**, 12, 131, 2018.

DENG J, FU L, WANG R, YU N, DING X, JIANG L, FANG Y, JIANG C, LIN L, WANG Y, CHE X. Comparison of MALDI-TOF MS, gene sequencing and the Vitek 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. **Journal of Thoracic Disease**, 6, 539-544, 2014.

DESAI AN, ANYOHA A, MADOFF LC, LASSMANN B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. **International Journal of Infectious Diseases**, 84, 48-53, 2019.

DHIMAN N, HALL L, WOHLFIEL SL, BUCKWALTER SP, WENGENACK NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. **Journal of Clinical Microbiology**, 49, 1614-1616, 2011.

DOIJAD SP, POHARKAR KV, KALE SB, KERKAR S, KALOREY DR, KURKURE NV, RAWOOL DB, MALIK SVS, AHMAD RY, HUDEL M, CHAUDHARI SP, ABT B, OVERMANN J, WEIGEL M, HAIN T, BARBUDDHE SB, CHAKRABORTY T. *Listeria goaensis* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68, 3285 - 3291, 2018.

DOUMITH M, BUCHRIESER C, GLASER P, JACQUET C, MARTIN P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(8): 3819-22, 2004.

European Food Safety Authority (EFSA). EFSA explains zoonotic diseases: *Listeria* [published 02/2014]. 2014a. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/factsheets/factsheetlisteria2014_tpfts> Acesso em: 27/04/2019.

FARBER JM, PETERKIN PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, 55(3): 476-511, 1991.

FEBBRARO F, RODIO D M, PUGGIONI G, ANTONELLI G, PIETROPAOLO V, TRANCASSINI M. MALDI-TOF MS Versus VITEK® 2: Comparison of systems for the identification of microorganisms responsible for bacteremia. **Current Microbiology**, 73(6), 843-850, 2016.

GANDHI M, CHIKINDAS ML. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, 13,1-15, 2007.

GANDRA EA, GANDRA TKV, MELLO WS, GODOI H.S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, 30, 109-118, 2008.

GASANOV U, HUGHES D, HANSBRO PM. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, 29, 851–875, 2005.

GOMES MJP. Gênero *Listeria* spp. 2015.

Disponível em: <www.ufrgs.br/labacvet/files/Gênero%20Listeria%204-2015.pdf>.

Acesso em: 05/12/2017.

GONÇALVES JS, CHEIRUBIM AP, DE BRITO KCT, DE BRITO BG. Detecção de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* através de técnica de PCR. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, 17(4), 2014.

GRAY ML, KILLINGER AH. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological Reviews**, 30, 309-382, 1966.

GREENHALGH T. How to read a paper: papers that report diagnostic or screening tests. **British Medical Journal**, 315: 540-3, 1997.

GUO L, YE L, ZHAO Q, MA Y, YANG J, LUO Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **Journal of Thoracic Disease**, 6, 534-538, 2014.

HOF H, ROCOURT J. Is any strain of *Listeria monocytogenes* detected in food a health risk? **International Journal of Food Microbiology**, 16(3): 173-182, 1992.

HOFER CB, MELLES CE, HOFER E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 41(6): 375-7, 1999.

HOFER E. Três Décênios de Experiência Sobre *Listeria* no Brasil. In: Mercadante AZ, editor. *Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas*. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimento/ Universidade Estadual de Campinas; 33 (2):111-115, 2001.

HOFER E, DO NASCIMENTO RS, DE OLIVEIRA MA. *Listeria monocytogenes* meningitis. Case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 31(2): 173-7, 1998.

HOFER E, HOFER CB. Listeriose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. vol. II. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 129, p.1539-1545, 2005.

HOFER E, REIS CMF. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 25(2): 79-83, 2005.

HOFER E, REIS CMF, HOFER CB. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 39(1): 32-7, 2006.

HOU TY, CHIANG-NI C, TENG SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. **Journal of Food and Drug Analysis**, 27(2): 404-414, 2019.

HUANG B, FANG N, DIMOVSKI K, WANG X, HOGG, G, BATES J. Observation of a New Pattern in Serogroup-Related PCR Typing of *Listeria monocytogenes* 4b Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. 49(1): 426–429, 2011.

HUDSON JA, LAKE RJ, SAVILL MG, SCHOLES P, MCCORMICK RE. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. **Journal of Applied Microbiology**, 90(4): 614-21, 2001.

International Organization for Standardization. ISO 11290-1:2017 :2017. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* — Part 1: Detection method. 2017.

JADHAV S, BHAVE M, PALOMBO EA. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, 88(3): 327-41, 2012.

JADHAV S, SEVIOR D, BHAVE M, PALOMBO EA. Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Journal of Proteomics**, 97, 100-106, 2014.

JAY JM. Microbiologia de Alimentos. 6^o edição, editora Artmed, p.517-542, Porto Alegre, 2005.

KLANČNIK A, TOPLAK N, KOVAC M, MARQUIS H, JERSEK B. Quantification of *Listeria monocytogenes* cells with digital PCR and their biofilm cells with real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 118, 37-41, 2015.

KLJUJEV I, RAICEVIC V, JOVICIC-PETROVIC J, VUJOVIC B, MIRKOVIC M, ROTHBALLER M. *Listeria monocytogenes* - Danger for health safety vegetable production. **Microbial Pathogenesis**, 120, 23-31, 2018.

KOHLMANN R, HOFFMANN A, GEIS G, GATERMANN S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. **International Journal of Medical Microbiology**, 305(4): 469-479, 2015.

LANDGRAF IM, KOBATA AMM, JAKABI M KIRSCHBAUM CRA, MARCHI CR. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 58(1): 63-7, 1999.

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

LEMES-MARQUES EG, CRUZ CD, DESTRO MT. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38, 287-292, 2007.

LIU D, AINSWORTH AJ, AUSTIN FW, LAWRENCE ML. Identification of a gene encoding a putative phosphotransferase system enzyme IIBC in *Listeria welshimeri* and its application for diagnostic PCR. **Letters in Applied Microbiology**, 38(2): 151-157, 2004.

McLAUHLIN J, MITCHELL RT, SMERDON WJ, JEWELL K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, 92(2): 159-164, 2004.

MEDEIROS LM. Criação da Bacterioteca de Bio-Manguinhos, Caracterização de Estirpes Bacterianas e Desenvolvimento de um Sistema Integrado de Identificação de

Microrganismos e de Rastreamento de Fontes de Contaminação. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

MENDONÇA KS, MICHAEL GB, NALÉRIO ÉS, MENDONÇA M, CARDOSO MRI, SILVA WPD. Genotypic profile of *Listeria monocytogenes* isolated in refrigerated chickens in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, 46(1): 132-137, 2016.

MEYER C, FREDRIKSSON-AHOMAA M, SPERNER B, MÄRTLBAUER E. Detection of *Listeria monocytogenes* in pork and beef using the VIDAS® LMO2 automated enzyme linked immunoassay method. **Meat Science**, 88(3): 594-596, 2011.

Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (MAPA). INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 9, de 8 de abril de 2009.

Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/dipoa/dipoa-pncp/listeria>>. Acesso em 27/04/2019.

Ministério da Saúde. Manual Integrado Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos VE-DTA. 2015.

Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ManuaVEDTA.pdf>. Acesso em: 05/12/2017.

MORENO AM, PAIXÃO R, MORENO LZ, DE GOBBI DDS, RAIMUNDO DC, FERREIRA TSP, HOFER E, MATTE MH, MORENO, M. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 50(2), 136-144, 2013.

MORENO LZ, PAIXÃO R, GOBBI DDS, RAIMUNDO DC, FERREIRA TSP, MORENO AM, HOFER E, REIS CMF, MATTÉ GR, MATTÉ MH. Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. **BioMed Research International**, 2014, 1-12, 2014.

MORENO LZ, PAIXÃO R, GOBBI DDS, RAIMUNDO DC, FERREIRA TSP, MORENO AM, HOFER E, REIS CMF, MATTÉ GR, MATTÉ MH. Characterization of antibiotic resistance in *Listeria* spp. isolated from slaughterhouse environments, pork and human infections. **Journal of infection in developing countries**, 8(4):416-23, 2014b.

MOURA A, DISSON O, LAVINA M, THOUVENOT P, HUANG L, LECLERCQ A, FREDRIKSSON-AHOMAA M, ESHWAR AK, STEPHAN R, LECUIT M. Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, 87(4), e00758-18, 2019.

MURRAY EGD, WEBB RA, SWANN MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes*. **Journal of Pathology and Bacteriology**, 29, 407-439, 1926.

MURRAY, PR. **Manual of Clinical Microbiology**. 6.ed. American Society for Microbiology Press, 1995.

OBAIDAT MM, BANI SALMAN AE, LAFI SQ, AL-ABBOODI AR. Characterization of *Listeria monocytogenes* from three countries and antibiotic resistance differences among countries and *Listeria monocytogenes* serogroups. **Letters in Applied Microbiology**, 60(6): 609-614, 2015.

OKTAY HM, HEPERKAN D. Evaluation of ISO Method and VIDAS automated System for Identifying *Listeria* and *Salmonella* in Selected Foods. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, 4, 133-145, 2006.

OTTAVIANI F, OTTAVIANI M, AGOSTI M. Differential Agar Medium for *Listeria monocytogenes*. In "Quimper froid. Symposium proceedings" P6 A.D.R.I.A. Quimper (F) 16-18, June 1997.

PALMA JM, LISBOA RC, RODRIGUES DP, SANTOS AF, HOFER E, SANTANA AP. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(10), 957-964, 2016.

PAVLOVIC M, HUBER I, KONRAD R, BUSCH U. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. **The Open Microbiology Journal**, 7, 135-141, 2013.

PEARSON LJ, MARTH EH. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal Science Dairy**, 73, 912-928, 1980.

PERRIN M, BEMER M, DELAMARE C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(11), 5308-5309, 2003.

PINTO M, BURRI S, MENA, C, ALMEIDA G, CARNEIRO L, TEIXEIRA P, GIBBS PA. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, 12(8): 511-514, 2001.

PIRIE JHH. A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease". **South African Institute for Medical Research**, 3, 163-186, 1927.

PIRIE JHH. Listeria: Change name for a genus bacteria. **Nature**, 145, 264, 1940.

PIZZARRO-CERDÁ J, COSSART P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Pathology**, 208, 215-223, 2006.

POURNAJAF A, RAJABNIA R, SEDIGHI M, KASSANI A, MOQARABZADEH V, LOTFOLLAHI L, ARDEBILLI A, EMADI B, IRAJIAN G. Prevalence, and virulence determination of *Listeria monocytogenes* strains isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex polymerase chain reaction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(5), 624-627, 2016.

RAHI P, PRAKASH O, SHOUCHE Y. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. **Frontiers in Microbiology**, 7, 2016.

REIS CMF, BARBOSA AV, RUSAK LA, VALLIM DC, HOFER E. 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, 2011.

ROCOURT J, ALONSO JM, SEELIGER HP. Comparative virulence of the 5 genomic groups of *Listeria monocytogenes* (sensu lato). **Annales de Microbiologie**, 134A (3):359-64, 1983.

RODRIGUES CS. Contaminação por *Listeria monocytogenes* em salsichas produzidas no Brasil em estabelecimentos registrados no serviço de inspeção Federal. Tese Mestrado. Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Distrito Federal, 2016.

RODRIGUES NMB, BRONZATO GF, SANTIAGO GS, BOTELHO LAB, MOREIRA BM, COELHO IDS, SOUZA MMSD, COELHO SDMDO. The Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) identification versus biochemical tests: a study with enterobacteria from a dairy cattle environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, 48(1): 132-138, 2017.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ B, CERCENADO E, COSTE AT, GREUB G. Review of the impact of MALDI-TOF MS in public health and hospital hygiene, 2018. **Eurosurveillance**, 24(4), 2019.

ROHDE A, HAMMERL JA, APPEL B, DIECKMANN R, AL DAHOUK S. Fishing for bacteria in food – A promising tool for the reliable detection of pathogenic bacteria. **Food Microbiology**, 46, 395–407, 2015.

ROSIMIN AA, KIM MJ, JOO IS, SUH SH, KIM KS. Simultaneous detection of pathogenic *Listeria* including atypical *Listeria innocua* in vegetables by a quadruplex PCR method. **LWT-Food Science and Technology**, 69, 601-607, 2016.

RYU J, PARK SH, YEOM YS, SHRIVASTAV A, LEE SH, KIM Y R, KIM HY. Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. **Food Control**, 32(2): 659-664, 2013.

SANTOS CAML, VIEIRA RHSF. Bacteriological hazards and risks associated with seafood consumption in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 55(4): 219-228, 2013.

SANTOS IC, HILDENBRAND ZL, SCHUG KA. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. **Analyst**, 141(10): 2827-2837, 2016.

SCHUCHAT A, SWAMINATHAN B, BROOME CV. Epidemiology of human listerioses. **Clinical Microbiology Reviews**, 4, 169-183, 1991.

SEELIGER HPR. Listeriosis. 2nd ed. **Hafner Publishing Company**, New York. 308p. 1961.

SEELIGER HPR, HÖHNE K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. **Methods in Bacteriology**, 31-49, 1979.

SENG P, DRANCOURT M, GOURIET F, LA SCOLA B, FOURNIER PE, ROLAIN JM, RAOULT D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, 49, 543-551, 2009.

SILVA CGD, TOBOUTI NR, ZOCCOLI CM, SILVEIRA ACO. Evaluation of VITEK 2 Compact and VITEK MS in the identification of coagulase-negative Staphylococci

isolated from blood cultures. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 53(5), 293-297, 2017.

SILVA HR, GIANOGLUO FM, CAMPOS MF, GRACIANO EMA, TOLEDO RCC. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. **Higiene Alimentar**, 30(262/263), 17-20, 2016.

SILVA NJV, SILVEIRA NFA, TANIWAKI NH, SANTOS RFS, GOMES RAR. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4 ed. São Paulo, SP: 2010.

SMITH AM, TAU NP, SMOUSE SL, ALLAM M, ISMAIL A, RAMALWA NR, DISENYENG B, NGOMANE M, THOMAS J. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in South Africa, 2017–2018: Laboratory Activities and Experiences Associated with Whole-Genome Sequencing Analysis of Isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, 16 (7), 2019.

STAROSTIN KV, DEMIDOV EA, BRYANSKAYA AV, EFIMOV VM, ROZANOV AS, PELTEK SE. Identification of *Bacillus* strains by MALDI TOF MS using geometric approach. **Scientific Reports**, 5, 1-9, 2015.

SUN JF, SHI ZX, GUO HC, LI S, TU CC. Proteomic analysis of Swine Serum following highly virulent classical swine fever virus infection. **Journal of Virology**, 8, 8-107; 2011.

SWAMINATHAN B, GERNER-SMIDT P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, 9(10):1236-43, 2007.

TAHOUN AB, ELEZ RMA, ABDELFATAH EN, ELSOHABY I, EL-GEDAWY AA, ELMOSLEMANY AM. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 10, 264-270, 2017.

TAO T, CHEN Q, BIE X, LU F, LU Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. **Food Control**, 73, 704-711, 2017.

TSUKIMOTO ER, ROSSI F. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry (VITEK-MS) compared to the ANC card (VITEK 2) for the identification of clinically significant anaerobes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 54(4): 206-212, 2018.

United States Food and Drug Administration. (US FDA). Preventing Listeria Infections: What You Need to Know. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/buystoreservesafefood/ucm079667.htm>>. Acesso em: 16/09/2019.

VALLIM DC, HOFER CB, LISBOA RC, BARBOSA AV, RUSAK LA, REIS CMF, HOFER E. Twenty Years of Listeria in Brazil: Occurrence of Listeria Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. **Biomed Research International**, Article ID 540204, 8 pages, 2015.

VÄLIMAA AL, TILSALA-TIMISJÄRVI A, VIRTANEN E. Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain – A review. **Food Control**, 55, 103-114, 2015.

VAZQUEZ-BOLAND JA, KUHN M, BERCHE P, CHAKRABORTY T, DOMINGUEZ-BERNAL G, GOEBEL W, GONZALEZ-ZORN B, WEHLAND J, KREFT J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(3), 584-640, 2001.

WALLET F, LOÏEZ C, RENAUX E, LEMAITRE N, COURCOL RJ. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, 43(9): 4402-4406, 2005.

WELLER D, ANDRUS A, WIEDMANN M, den BAKKER HC. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65(1): 286-92, 2015.

World Health Organization (WHO). Disease outbreaks News. Listeriosis-South Africa. March 2018. Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/> Acesso em: 27/04/2019.

ANEXOS

Anexo A - Testes suplementares ao cartão GP (Continua).

Abreviatura	Nome do Teste	Descrição	Comentários
A-HEM	ALFA-HEMÓLISE	Algumas espécies produzem hemólise incompleta, o que resulta numa coloração verde à volta das colónias presentes em meios com sangue.	
AMD/STARCH GLYCOGENac, IARABINOSE, INULIN, MdG, MdM, PULLULAN, SACCHAROSE, dMALTOSE, dMANNITOL, dMANNOSE, dMELEZIT, dMELIBIOSE, dRAFFINOSE, dRIBOSE, dSORBITOL, dTREHALOSE, dXYLOSE, IRHAMNOSE	Acidificação de: AMIDON/AMIDO, GLICOGÉNIO, IARABINOSE, INULINA, METIL-B-D-GLUCOPIRANOSÍ- DEO, METIL-B-D-MANOPIRANO- SIDA, PULULANO, SACAROSE (SUCROSE), D-MALTOSE, D-MANITOL, D-MANOSE, D-MELEZITOSE, D-MELIBIOSE, D-RAFINOSE, D-RIBOSE, D-SORBITOL, D-TREALOSE, D-XILOSE, L-RAMNOSE	Acidificação da fonte de carbono observada com indicadores de pH (ex: vermelho de fenol, púrpura de bromocresol, etc).	Alguns testes aparecem também na carta GP, mas são recomendados como testes suplementares, dado que os resultados dos macrométodos convencionais podem divergir dos micrométodos comerciais rápidos.
ANANE, AIFUC, BGLU, BGURase, BNAG, BNAGA, BdFUC, PAL, Pyrr. Ary.	ALFA-D-N-ACETILNEURAMI- NIDASE, ALFA-L-FUCOSIDASE, BETA-GLUCOSIDASE, BETA-GLUCORONIDASE, BETA-N-ACETIL-GLUCOSAMI- NIDASE, BETA-N-ACETIL-GALACTOSA- MINIDASE, BETA-D-FUCOSIDASE, FOSFATASE ALCALINA, Pirrolidonil ARILAMIDASE	A presença da respectiva enzima quebra o substrato que produz um grupo de partida detectável (ex: p-nitrofenol, metil umbeliferona, betanaftilamida, beta-naftol, p-nitroanilina, 7-amidometil-cumarina, etc.).	A presença de enzimas é indicada pelo aparecimento de um produto colorido ou fluorescente, ou um produto não colorido, que forma cor após a adição de um reagente específico.
Adherence	Aderência à gelose	Fixação de colónias na superfície da gelose.	Característica de <i>Rothia mucilaginosa</i> .
AER.GROWTH	CRESCIMENTO AERÓBIO	Crescimento ao ar.	

Anexo A - Testes suplementares ao cartão GP (Continuação).

Abreviatura	Nome do Teste	Descrição	Comentários
Arg.hydr.	Dihidrolase da ARGININA	A hidrólise da arginina liberta amónia resultando na alcalinização do meio observado com um indicador de pH (ex: formação de cor vermelha na presença de púrpura de bromocresol).	
B-HEM	BETA HEMATOSE	Algumas espécies possuem hemolisinas que produzem uma zona transparente à volta das colónias em geloses de sangue.	
BILE ESC	BÍLIS ESCULINA	Os microrganismos positivos à bílis esculina têm capacidade para crescer na presença de bílis a 40% e para hidrolisar a esculina.	
BILE SOL	SOLUBILIDADE DA BÍLIS	As colónias pneumocócicas lisam completamente e desaparecem quando expostas a uma solução de desoxicolato a 10%.	Teste rápido para <i>Streptococcus pneumoniae</i> .
CAMP (S.au)	TESTE CAMP (<i>Staph. aureus</i>)	Hemólise sinérgica das colónias de <i>Listeria monocytogenes</i> por colónias de <i>Staphylococcus aureus</i> produtoras de beta-toxina.	
CAROTENOID	PIGMENTO CAROTENÓIDE	Presença de pigmento vermelho, rosa ou laranja.	
CAT	CATALASE	Ao colocar uma colónia numa gota de peróxido de hidrogénio a 3% esta produz bolhas de gás. As bactérias que contêm enzima citócromo são positivas à catalase.	Diferenciação entre <i>Micrococcaceae</i> (+) e <i>Streptococcaceae</i> (-).

Anexo A - Testes suplementares ao cartão GP (Continuação).

Abreviatura	Nome do Teste	Descrição	Comentários
CLINDA.S	Sensível à clindamicina	Zona de inibição à volta do disco de clindamicina ≥ 20 mm.	Usado para diferenciar <i>Lactococcus lactis</i> e <i>Lactococcus garvieae</i> .
ESCULIN	Hidrólise da ESCULINA	A hidrólise da esculina forma esculetina, que produz um pigmento preto na presença de sais de ferro.	
Gas prod.	Produção de gás	Produção de CO ₂ a partir da degradação do metabolismo dos hidratos de carbono (ex; glucose).	
HIP	Hidrólise do HIPURATO	A hidrólise do hipurato de sódio liberta glicina, que produz um produto de cor azul após a adição de ninidrina.	
LitmusMILK	Meio de Leite Tomassolado	Produção ácida em Leite Tomassolado.	
NaCl 6.5%	CRESCIMENTO EM NaCl 6,5%	Crescimento em caldo de NaCl a 6,5%.	
NO3	REDUÇÃO DE NITRATO	Teste que analisa a capacidade de reduzir o nitrato a nitrito ou a gás nitrogénio.	
NOVO_R, OPTO_R, VANCO_R	RESISTÊNCIA À NOVOBIOCINA, RESISTÊNCIA À OPTOQUINA, RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	Capacidade de determinadas espécies de crescer na presença de compostos antibacterianos específicos.	
NaCl 7.5%	CRESCIMENTO EM NaCl a 7,5%	Capacidade de certas espécies de crescer na presença de uma concentração elevada de NaCl.	
PI/OR/RED	PIGMENTO ROSA/LARANJA/ VERMELHO	Capacidade de determinadas espécies em desenvolverem colónias rosas, laranjas e vermelhas em meios não diferenciais.	Característica de <i>Kocuria rosea</i> .

Anexo A - Testes suplementares ao cartão GP (Concluído).

Abreviatura	Nome do Teste	Descrição	Comentários
PVATE	PIRUVATO	Capacidade de usar o piruvato como única fonte de carbono.	
SATELLITE	Comportamento SATÉLITE	Aparecimento de colónias satélite de <i>Streptococcaceae</i> nutricionalmente deficientes, à volta de colónias de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> .	<i>Streptococcaceae</i> nutricionalmente deficientes necessitam de factores nutricionais fornecidos pelo metabolismo de colónias de <i>Staphylococcus epidermidis</i> ou <i>Staphylococcus aureus</i> .
Str.sero.A Str.sero.B Str.sero.C Str.sero.D Str.sero.G	Estrepto Serologia A, Estrepto Serologia B, Estrepto Serologia C, Estrepto Serologia D, Estrepto Serologia G	Testes de aglutinação para <i>Streptococcus</i> grupos A, B, C, D e G.	
UREASE	Urease	A hidrólise da ureia liberta amónia resultando na alcalinização do meio observado com um indicador de pH (ex: formação de cor vermelha na presença de vermelho de fenol).	
VP	VOGES PROSKAUER	Capacidade de determinadas espécies para produzirem acetona a partir da fermentação da glucose.	
YELLOW	PIGMENTO AMARELO	Capacidade de determinadas espécies de desenvolver colónias com pigmento amarelo em meios não diferenciais.	Utilizado, por exemplo, para diferenciar <i>E. casseliflavus</i> (+) de <i>E. gallinarum</i> (-).

Fonte: Manual VITEK 2 Compact® (BIOMERIEUX, 2019).