



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
Doutorado em ciências Biológicas

Ana Paula Rocha da Costa

Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil

Recife
2013



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas
Doutorado em ciências Biológicas

Ana Paula Rocha da Costa

Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Orientadora: Dra Alzira Maria Paiva de Almeida

Co-orientadora: Dra Nilma Cintra Leal

Recife
2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Costa, Ana Paula Rocha da

Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* de casos clínicos e alimentos no Brasil/ Ana Paula Rocha da Costa– Recife: O Autor, 2013.

121 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Alzira Maria Paiva de Almeida

Coorientadora: Nilma Cintra Leal

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Ciências Biológicas, 2013.

Inclui bibliografia e anexos

- 1. *Listeria monocytogenes* 2. Virulência (microbiologia) 3. Diagnóstico molecular I. Almeida, Alzira Maria Paiva de (orientadora) II. Título**

579.37

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 131

Ana Paula Rocha da Costa

Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Apresentada em: 28/02/2013

Banca Examinadora

Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompilio de Melo
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Dra. Danielle Maria Nascimento Moura
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE

Prof. Dr. Franklin Barbalho Magalhães
Associação Caruaruense de Ensino Superior - ASCES

Ao meu querido tio Luis Ferreira
Rocha (*in memorian*), exemplo de
comprometimento e amor à família;
um de meus maiores incentivadores.

Agradecimentos

A Deus, por minha saúde e por sempre me indicar o melhor caminho a seguir, mesmo que às vezes eu não compreenda;

À minha família, por estar ao meu lado em todos os momentos. Aos meus pais, por minha educação e por tudo que fizeram para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão pelo apoio e amizade. A Thiago Luiz, por ter aceitado me ter pela metade durante a execução desse trabalho;

À Dra Alzira, por ter tornado possível a realização do doutorado. Por todas as orientações e dedicação a mim dispensadas;

A Dra Nilma Cintra Leal, pela oportunidade, por todos os ensinamentos trocados durante esses quase oito anos de convívio, por sua confiança e incentivo;

Ao Dr Ernesto Hofer e Deyse Vallim, do Laboratório de Zoonoses Bacterianas, IOC/FIOCRUZ por toda a colaboração na realização desse trabalho;

Ao Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, coordenador do laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), da Universidade Federal Rural de Pernambuco e sua equipe, em especial a Jacqueline Ellen, Roberta Ventura e Tacyana Ralph por toda a colaboração na realização dos experimentos de infecção animal;

A biomédica Natália Regina Souza da Silva, pela colaboração na realização desse trabalho durante sua iniciação científica.

A Mariana de Lira Nunes e Carina Lucena Mendes-Marques, por toda a cooperação e ajuda tanto na realização dos experimentos quanto na redação dos trabalhos.

Aos pesquisadores do departamento de microbiologia do CPqAM-FIOCRUZ/PE, Dra Cristina Leal-Balbino, Dr. Christian Reis, Dra Marise Sobreira, Dra Regina Bressan e Dr. Osvaldo Pompílio por toda a colaboração.

Aos técnicos do departamento de microbiologia do CPqAM-FIOCRUZ/PE, Cláudio Eduardo, Fabiana Laura, Iara Nakazawa, Niedja Azevedo e Silvana Santos, pelo apoio técnico.

Aos amigos do CPqAM, Amaranta Malvezzi, Artur Leonel, Beatriz Toscano, Camila Cavalcanti, Camylla Carvalho, Carina Mendes, Carolina Luz, Diogo Chalegre, Edlene Ribeiro, Daniele Moura, Érika de Cássia, Felipe Lira, Jana Sandes, Janaina Nascimento, João

Ramos, Katharina Diniz, Kennya Lopes, Larissa Nascimento, Lígia Ferreira, Ludmila Arruda, Natália Regina, Mariana Marques, Mariana Andrade, Rodrigo Pontes, Marília Nascimento, Paloma Montarroyos, Rômulo Moraes, Rosanny Holanda, Tamara De Carli, Vladmir Silveira, e em especial a Eduarda Magueira, Ewerton Ferreira, Livia Alves, Mariana Nunes e Wagner Oliveira pelo convívio diário e todas as experiências trocadas.

Aos meus colegas de turma de doutorado e companheiros nessa jornada, Mariana Donato e Wagner Oliveira, por compartilharem cada momento desse desafio;

Ao Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para a Saúde PDTIS-FIOCRUZ, pelo uso de suas facilidades;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela infraestrutura e disponibilidade de recursos para a realização desse trabalho;

A Universidade Federal de Pernambuco, minha casa durante os últimos dez anos, e em especial ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de realizar mais esse objetivo;

A bibliotecária Teresa Cristina Moreira, coordenadora da biblioteca do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, por toda a colaboração na formatação dessa tese.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de estudos concedida;

E a todos que não foram citados, mas foram igualmente importantes nessa jornada.

“Nossa maior fraqueza está em desistir.
O caminho mais certo de vencer é tentar
mais uma vez”.

Thomas Edison

“E ainda que tivesse o dom da profecia e
conhecesse todos os mistérios da ciência,
e ainda que tivesse toda a fê, sem amor
nada seria”

ICo 13:2

Resumo

Listeria monocytogenes é um bacilo gram-positivo, intracelular facultativo, transmitido por alimentos, que pode causar doença, a listeriose, em indivíduos susceptíveis. Embora rara, a listeriose tem grande importância para a saúde pública pela sua alta letalidade. Este trabalho teve como objetivo, identificar marcadores moleculares para utilização no desenvolvimento de nova técnica de diagnóstico molecular da listeriose. Os estudos envolveram sorotipagem, tipagem molecular pela amplificação das sequências 23S, 16S-23S e RAPD, pesquisa de plasmídios e de genes de virulência (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *hly*, *iap*, *plcA*, *actA*) em 135 cepas de *L. monocytogenes* de casos humanos e alimentos isoladas no Brasil no período de 1975 a 2001; infecção experimental em camundongos com cepas portando ausência ou alterações em genes de virulência; e a caracterização de isolados de um caso de endocardite atendido numa unidade de emergência cardiológica em Recife, PE, em 2010. Nenhuma relação foi encontrada entre a origem das cepas, sorotipos, perfis genéticos, conteúdo plasmidial e distribuição dos genes de virulência. Os ensaios de infecção experimental em camundongos também não permitiram estabelecer uma relação entre a presença dos marcadores de virulência considerados no estudo e as respostas dos animais inoculados. Seis isolados de hemocultura de um caso de endocardite com identificação presuntiva de *Listeria* spp. foram classificados como *L. monocytogenes* sorotipo 4b pela amplificação por PCR dos genes 23S, *lmo2243* e ORF2210 específicos do gênero *Listeria*, espécie *L. monocytogenes* e sorotipo b respectivamente. Todos os genes de virulência pesquisados foram detectados por PCR nas amostras e a análise do perfil de amplificação da sequência 16S-23S revelou que os seis isolados são uma mesma cepa. Embora esses estudos não tenham revelado nenhum marcador molecular de patogenicidade, a alta frequência de genes de virulência observada entre cepas dos sorotipos mais patogênicos (1/2a, 1/2b, 4b) evidencia o potencial patogênico nas cepas brasileiras de *L. monocytogenes* e a necessidade de incrementar a vigilância e diagnóstico dessa bactéria. Considerando a prevalência dos sorotipos 1/2a, 4b nas amostras clínicas e dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 4b em alimentos, desenvolvemos e padronizamos um procedimento baseado em LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) para identificação desses sorotipos. A técnica é rápida e de fácil operacionalização, utiliza um bloco de aquecimento ou banho-maria e o produto da reação pode ser visualizado a olho nu mediante adição de reagentes fluorescentes. O procedimento padronizado mostrou-se sensível, capaz de detectar 100pg de DNA ou 10⁴ UFC, e espécie - específica, capaz de diferenciar *L. monocytogenes* de espécies intimamente relacionadas geneticamente. Outros sorotipos intimamente relacionados (3a, 3b, 4e e 4d) foram amplificados sem detrimento da técnica porque são raramente encontrados em amostras humanas e animais. A técnica LAMP se apresenta como uma alternativa fácil e rápida para diagnóstico e tipagem de *L. monocytogenes* especialmente para os programas de vigilância e investigação epidemiológica.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*. Virulência. Diagnóstico. LAMP

Abstract

Listeria monocytogenes is a gram-positive bacillus, facultative intracellular, food born pathogen, which can cause a disease, listeriosis, in susceptible individuals. Although rare, listeriosis has public health importance for its high lethality. This study aimed to identify molecular markers to employ in the development of a new molecular technique for listeriosis diagnosis. The study involved serotyping, molecular typing through amplification of the sequences 23S, 16S-23S and RAPD, research of plasmids and virulence genes (*inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *hly*, *iap*, *plcA*, *actA*) in 135 *L. monocytogenes* strains isolated from foods and human cases in Brazil from 1975 to 2001; experimental infection in mice with strains lacking virulence genes or carrying mutated virulence genes; and characterization of isolates from an endocarditis case attended in a cardiac emergency unit in Recife, PE in 2010. No relationship was found between the origin of the strains, serotypes, genetic profiles, plasmid content and distribution of the virulence genes. Experimental infection in mice also failed to establish a relationship between the presence of virulence markers considered in the study and the animal responses. Six isolates from blood culture from the endocarditis with presumptive identification of *Listeria* species were classified as *L. monocytogenes* serotype 4b by PCR amplification of the 23S, *lmo2243* and ORF2210 genes specific for genus, species and serotype respectively. All virulence genes assessed were detected by PCR, and the analysis of the amplification profile of the 16S-23S sequence clustered the six isolates in a unique strain. Although these studies did not uncover any molecular pathogenicity marker, the high frequency of virulence genes observed among strains of the higher pathogenic serotypes (1/2a, 1/2b, 4b) highlights the pathogenic potential of Brazilian *L. monocytogenes* strains and the need to tighten the bacterium surveillance and diagnosis. Given the prevalence of 1/2a, 4b serotypes in clinical samples and the 1/2a, 1/2b, 4b serotypes in foods, we developed and standardized a LAMP (loop-mediated isothermal amplification) based procedure for these serotypes identification. The technique is fast and easy, using a heating block or water bath and the reaction product can be visualized by naked eye by adding fluorescent reagents; it is sensible, detecting 100pg DNA or 10⁴ CFU, and species - specific, distinguishing close genetically related *Listeria* species. The closely related serotypes (3a, 3b, 4e and 4d) were amplified without impairing the technique, for they seldom occur among human and animal isolates. Therefore, the developed procedure proved to be a quick and easy alternative for *L. monocytogenes* diagnosis and typing mainly in the surveillance programs and epidemiological research.

Keyword: *Listeria monocytogenes*. Virulence. Diagnosis. LAMP.

Lista de ilustrações

Revisão Bibliográfica

Figura 1- Composição dos antígenos somático (O) e flagelar (H) nos sorotipos de <i>Listeria</i>	19
Figura 2 - Etapas da infecção por <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Figura 3 - Organização esquemática do regulon PrfA.....	27
Figura 4 - Representação esquemática dos seis primers usados na reação de LAMP mostrando as posições de hibridização com o gene alvo.....	29
Figura 5- Princípio do método de amplificação isotérmica mediada por <i>loop</i>	31
Figura 6 – Representação esquemática dos <i>loop</i> primers na reação LAMP.....	32

Artigo 1

Fig. 1 Representative rDNA 16S- 23S rDNA ITS profiles.....	60
Fig. 2 Representative RAPD profiles of <i>Listeria monocytogenes</i> strains in 1.5% agarose gel.....	61

Artigo 2

Figura 1. Curva de sobrevivência dos camundongos após desafio com <i>Listeria monocytogenes</i>	76
Figura 2. Número de unidades formadoras de colônias (CFU) de <i>L. monocytogenes</i> em sangue (<i>blood</i>), baço (<i>spleen</i>) e cérebro (<i>brain</i>) de camundongos infectados e eutanasiados.....	77

Artigo 3

Figure 1: Multiple alignments of partial sequences showing the 105 bp deletion of <i>actA</i> gene in samples from blood cultures compared with reference strains.....	87
Figure 2: PCR ribotyping profile.....	88

Artigo 4

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação por LAMP..	102
Figura 2: Produtos amplificados por LAMP.....	102

Lista de tabelas

Revisão Bibliográfica

Tabela 1: Surto alimentares internacionais de listeriose invasiva (1980 – 2005).....	21
--	----

Artigo 1

Table 1. Distribution of the serotypes among the clinical and food originated <i>Listeria monocytogenes</i> isolates.....	56
--	----

Table 2. Distribution of the plasmid content and serotypes identified among human and food originated <i>Listeria monocytogenes</i> isolates.....	57
--	----

Table 3. Distribution of the genes amplified by PCR according to the source of the isolates.....	58
---	----

Table 4. Distribution of the ITS profiles and serotypes identified among human and food originated <i>Listeria monocytogenes</i> isolates.....	59
---	----

Artigo 2

Tabela 1: Características das cepas analisadas.....	74
---	----

Tabela 2 - Contagem total e diferencial de leucócitos em esfregaços sanguíneos de camundongos Swiss após desafio com cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	75
---	----

Artigo 4

Tabela 1 - Cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas.....	100
---	-----

Tabela 2 - <i>Primers</i> usados: alvos, denominação, sequências.....	101
---	-----

Lista de abreviaturas e siglas

AFLP - Polimorfismo de fragmento amplificado
AFLP - Polimorfismo de tamanho de fragmento amplificado
AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
DL50 - Dose letal média
DNA –Ácido desoxirribonucleico
FNR - Regulador fumarato nitrato redutase
HEp-2 - linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano,
HPT - hexose fosfato translocase
INL – Internalina
ITS – Região espaçadora interna
LAMP - Amplificação isotérmica mediada por loop
LIPI 1 – Ilha de patogenicidade de *Listeria* 1
LLO - Listeriolisina O
LPXTG – Motivo leucina – prolina, treonina – glicina
MLEE – Eletroforese de enzimas codificadas por multilocus
MLST – Tipagem de sequencia multilocus
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP - Polimorfismo de fragmentos de restrição de produtos de PCR
PFGE – Eletroforese em gel de campo pulsátil
PLC - *Phosphatidylinositol-specific phospholipase*
RAPD - Amplificação aleatória de segmento polimórfico de DNA
REP-PCR - PCR de elemento repetitivo
UFU - Unidades formadoras de colônia
UV – Ultravioleta
Vero - Células fibroblásticas renais de macaco verde da África

Sumário

1 Introdução.....	13
2 Objetivos.....	15
3 Revisão Bibliográfica.....	16
3.1 Gênero <i>Listeria</i>	16
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.2.1 Patogenicidade de <i>L. monocytogenes</i>	22
3.2.1.1 Adesão e invasão celular.....	22
3.2.1.2 Lise do fagossoma e replicação intracelular.....	24
3.2.1.3 Motilidade baseada em actina e propagação célula a célula.....	25
3.2.1.4 Regulação dos fatores de virulência.....	26
3.3 Métodos empregados na identificação e tipagem de <i>L.monocytogenes</i>	27
3.3.1 Detecção por sondas genéticas.....	27
3.3.2 Detecção por amplificação de ácido nucleico.....	28
3.3.2.1 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP).....	28
3.3.3 Subtipagem.....	32
3.3.4 Determinação de virulência.....	32
3.3.4.1 Ensaio de virulência em animais.....	33
3.3.4.2 Modelos de listeriose <i>in vitro</i>	34
Referências.....	35
Artigo 1.....	42
Artigo 2.....	62
Artigo 3.....	78
Artigo 4.....	89
Anexo A : Parecer do comitê de ética animal.....	103
Anexo B: Normas das revistas.....	104

1 Introdução

Listeria monocytogenes, bactéria Gram positiva transmitida por alimentos, é o agente causador da listeriose, doença que varia de quadros brandos a muito graves, como meningite ou aborto; *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo e embora infectante para todos os grupos populacionais humanos, os problemas severos decorrentes da infecção ocorrem principalmente em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometidos. Encontrando-se disseminada em diversas fontes ambientais as oportunidades de contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* durante o processo de produção são numerosas (RAMASWAMY et al., 2007).

No interior do hospedeiro *L. monocytogenes* parasita macrófagos e invade ativamente células consideradas não fagocíticas, como células epiteliais, hepatócitos, fibroblastos e células do endotélio e tecido nervoso (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). A entrada em fagócitos não profissionais é mediada por proteínas de superfície, da família das internalinas, que interagem com receptores específicos na célula hospedeira desencadeando a fagocitose (internalinas InlA e InlB) e InlJ que estimula a aderência bacteriana às células hospedeiras, o que favorece a internalização (SABET et al., 2008). Após a entrada na célula hospedeira, outras proteínas de virulência auxiliam a bactéria a promover o escape do vacúolo, como listeriolisina O (LLO, uma toxina formadora de poro), as fosfolipases PlcA e PlcB e a protease Mpl. Após escapar do vacúolo ocorre a replicação citosólica (*hpt*) e movimento celular dependente de actina (*actA* e *inlC*) que permite a disseminação dos microrganismos às células adjacentes, onde o ciclo se reinicia (HAMON; BIERNE; COSSART, 2006). A expressão de quase todos os produtos de genes bacterianos que contribuem para a sobrevivência e virulência de *L. monocytogenes*, incluindo os genes presentes na ilha de patogenicidade 1 de *Listeria* (LIPI-1) *hly*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *mpl* e três loci cromossômicos adicionais, o operon *inlAB* e os genes *inlC* e *hpt* é regulada por um ativador de transcrição conhecido como fator regulador positivo A (PrfA) (DE LAS HERAS et al., 2011).

L. monocytogenes possui um complexo mecanismo de virulência e apresenta um espectro de cepas ou genótipos de variado potencial patogênico: algumas cepas são altamente patogênicas e provocam infecções fatais enquanto outras são relativamente avirulentas e causam apenas pequenos danos ao hospedeiro (LIU, 2006).

A identificação de cepas de *L. monocytogenes* é tradicionalmente realizada através de provas bioquímicas e sorotipagem por aglutinação ou reação

imunoenzimática (ELISA) (Palumbo et al., 2003). Pela aglutinação foram identificados 12 sorotipos com base nos antígenos O (somático) e H (flagelar), mas pelo menos 95% dos isolados de alimentos e pacientes pertencem a três sorotipos (1/2a, 1/2b e 4b) considerados os mais patogênicos da espécie (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil foram incluídas nesse estudo com o objetivo de compreender o papel dos genes de virulência na patogenicidade do microrganismo e possivelmente relacionar genes específicos a sorotipos patogênicos. Dessa forma, espera-se identificar marcadores que possam ser utilizados em testes moleculares mais rápidos, precisos e específicos que os testes de diagnóstico e tipagem tradicional o que pode facilitar a identificação do microrganismo contribuindo para o efetivo controle e prevenção da listeriose, assim como na execução de medidas sanitárias no controle de alimentos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a presença dos genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *hly*, *iap*, *plcA* e *actA* em cepas de *L. monocytogenes*;;
- Identificar polimorfismo de genes de virulência pelo sequenciamento dos amplicons que apresentem variação no tamanho;
- Avaliar a virulência de cepas de *L. monocytogenes* com alterações nos genes de virulência através da análise de velocidade de colonização em órgãos alvo em animais de laboratório;
- Desenvolver um método molecular de diagnóstico de *L. monocytogenes* e identificação de cepas patogênicas.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Gênero *Listeria*

O gênero *Listeria* é formado por um grupo de bactérias Gram positivas geneticamente relacionado aos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*. *Listeria* spp. são pequenos bacilos anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, desprovidos de cápsula, flagelados e móveis (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001); tolerantes a variações extremas de pH, temperatura e concentrações de sal, são largamente disseminados em várias fontes ambientais que incluem solo, água, vegetais, plantas em decomposição, esgotos e fezes humanas e de animais (LIU, 2006). Ruminantes domésticos provavelmente tem um papel na manutenção de *Listeria* spp. no ambiente rural via um contínuo ciclo de enriquecimento fecal-oral. O gênero inclui oito espécies: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. rocourtiae* e *L. marthii*. As espécies *L. rocourtiae*, isolada de alfaces na Áustria em 2002 e *L. marthii*, de um lago da Finger Lakes National Forest, New York, EUA, em 2009 foram as descritas mais recentemente (GRAVES et al., 2010; LECLERCQ et al., 2010).

Duas espécies do gênero são potencialmente patogênicas, *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* infecta humanos e outros animais, incluindo aves domésticas e selvagens e mamíferos, afetando principalmente o sistema nervoso central (meningoencefalites), mas também é responsável por sepse, aborto e gastroenterites (RAMASWAMY et al., 2007) e *L. ivanovii* que infecta predominantemente ruminantes causando enterites, sepse neonatal e aborto, mas sem envolvimento do sistema nervoso central (BUCHRIESER et al., 2011) e raramente é associada a doença em humanos (GUILLET et al., 2010). A ecologia de *L. ivanovii* sugere que a raridade de sua ocorrência em humanos deve-se não somente a fatores de tropismo no hospedeiro, mas também a baixa ocorrência dessa espécie no meio ambiente, em comparação com *L. monocytogenes* (GUILLET et al., 2010). Cada uma dessas duas espécies patogênicas de *Listeria* está intimamente relacionada geneticamente a espécies não patogênicas; *L. monocytogenes* com *L. innocua* e *L. marthii* (GRAVES et al., 2010), e *L. ivanovii* com *L. seeligeri* (SCHMID et al., 2005). Muitos isolados das espécies consideradas não patogênicas podem conter homólogos dos principais *clusters* de genes de virulência de *Listeria* (DEN BAKKER et al., 2010) e dessa forma, podem eventualmente atuar como

patógenos oportunistas, como por exemplo, um caso de bacteremia por *L. grayi* em paciente transplantado (SALIMNIA et al., 2010).

As diversas espécies do gênero *Listeria* compartilham muitas características morfológicas e propriedades bioquímicas; as colônias apresentam um crescimento característico do tipo guarda-chuva, desenvolvido 3-5 mm abaixo da superfície do meio motilidade semissólido quando incubadas a 20-30°C, mas não a 37°C; são catalase positiva, oxidase e indol negativo, podem hidrolisar esculina, mas não a ureia. Outras propriedades auxiliam na identificação das espécies como variações significativas na capacidade de hemolisar hemácias de cavalo ou carneiro e produção de ácido a partir de L-raminose, D-xilose e alfa metil-D manosídeo (LIU, 2006). *L. ivanovii* diferencia-se das outras espécies do gênero pela produção de uma zona ampla clara ou dupla de hemólise em Agar sangue de ovelhas ou cavalos, teste de CAMP positivo com *Rhodococcus equi*, mas não com *Staphylococcus aureus* hemolítico, e fermentação de D-xilose, mas não a L-ramnose (LIU, 2006); pela reação de lecitinase forte com ou sem carvão no meio, distingue-se de *L. monocytogenes*, que requer carvão vegetal (ERMOLAEVA et al., 2003).

A identificação das espécies de *Listeria* por testes bioquímicos é um processo trabalhoso, que envolve isolamento primário em meios seletivos e de enriquecimento, seguido por coloração de Gram e múltiplas provas bioquímicas. Para o isolamento de *Listeria* durante o processamento de alimentos, um pré-enriquecimento em meio líquido contendo tampão fosfato e inibidores também é necessário. Assim, a identificação além de trabalhosa, é demorada (levando até seis dias para finalizar o diagnóstico) e dispendiosa. Além disso, como testes bioquímicos avaliam características fenotípicas da bactéria, os resultados podem ser influenciados por fatores externos que afetam o crescimento e metabolismo bacterianos (LIU et al., 2005).

As espécies de *Listeria* possuem proteínas de superfície grupo-específico, como os antígenos, somático (O) e flagelar (H) que são usados como alvo para detecção sorológica. Existem 15 subtipos do antígeno somático O (I-XV), e o antígeno flagelar H compreende quatro subtipos (A-D), que em combinações únicas identificam os sorotipos de cepas de *Listeria* (Figura 1). No mínimo 12 sorotipos já foram identificados em *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), sete em *L. seeligeri* (1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c e 6b), um em *L. ivanovii* (5) e três em *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi* (1/2b, 6a and 6b) (LIU, 2006). Uma vez que as provas de aglutinação não são facilmente adaptáveis para testes de diagnóstico de alto

rendimento foi desenvolvido um teste imunoenzimático (ELISA) para melhorar a eficiência dos testes de sorotipagem (PALUMBO et al., 2003).

Além da importância na diferenciação de espécies de *Listeria*, a sorotipagem é potencialmente útil para definir subtipos e grupos clonais de *L. monocytogenes*. Foi observado que os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b de *L. monocytogenes* são responsáveis por 98% dos casos de listeriose humana, enquanto os sorotipos 4a e 4c são raramente associados a surtos da doença (JACQUET et al., 2002; WIEDMANN et al., 1996). Enquanto o sorotipo 4b é o principal responsável de surtos de listeriose, os sorotipos 1/2a e 1/2b estão ligados a infecção esporádica por *L. monocytogenes* (WIEDMANN et al., 1996). No entanto, devido principalmente ao alto custo de aquisição de antissoros subtipo específicos, a sorotipagem não é rotineiramente realizada em laboratórios clínicos; outro fator limitante do potencial de aplicação clínica generalizada é que a sorotipagem não permite estabelecer uma correlação dos sorotipos diretamente com as espécies, visto que diferentes espécies compartilham vários sorotipos. Além disso, cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos possuem antígenos em comum, por exemplo: 1/2a e 3c contêm os antígenos H - A e B; 4a-d, 1/2b e 3b contêm os antígenos H - A, B e C; 1/2c e 3a contêm os antígenos H - B e D; e vários outros sorotipos contêm antígenos O em comum (Figura 1), o que dificulta a determinação conclusiva do sorotipo de algumas cepas (LIU et al, 2006; SCHONBERG et al, 1996). Como as provas bioquímicas, a sorotipagem também é susceptível a ocasionar resultados discrepantes devido à sua dependência de características fenotípicas das cepas analisadas. Por essas razões, os métodos de sorotipagem têm sido substituídos por procedimentos moleculares que são intrinsecamente mais específicos e sensíveis para a identificação e diferenciação de espécies de *Listeria* (LIU, 2006).

Figura 1 - Composição dos antígenos somático (O) e flagelar (H) nos sorotipos de *Listeria*

Sorotipo	Antígeno O	Antígeno H
1/2a	I, II	A, B
1/2b	I, II	A, B, C
1/2c	I, II	B, D
3a	II, IV	A, B
3b	II, IV	A, B, C
3c	II, IV	B, D
4a	(V), VII, IX	A, B, C
4b	V, VI	A, B, C
4c	V, VII	A, B, C
4d	(V), VI, VIII	A, B, C
4e	V, VI, (VIII), (IX)	A, B, C
7	XII, XIII	A, B, C
5	(V), VI, (VIII), X	A, B, C
6a	V, (VI), (VII), (IX), XV	A, B, C
6b	(V), (VI), (VII), IX, X, XI	A, B, C

Fonte: Adaptado de LIU, 2006

3.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é responsável por uma grave doença de origem alimentar cujas manifestações clínicas vão de gastroenterites a formas invasivas mais severas, incluindo sepse, meningite, infecções perinatais e aborto. Em indivíduos imunocompetentes a listeriose não invasiva se desenvolve como uma gastroenterite febril típica. Em adultos imunocomprometidos, como pacientes idosos e pacientes recebendo agentes imunossupressores, a listeriose pode se manifestar como septicemia ou meningoencefalite. A listeriose invasiva pode ser adquirida pelo feto a partir da mãe infectada, via placenta. A listeriose perinatal pode levar a aborto, nascimento prematuro ou meningite no recém-nascido (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

A incidência de listeriose humana é relativamente baixa, em parte devido ao rígido controle de alimentos (ALLERBERGER; WAGNER, 2010; AGÊNCIA..., 2001), mas a doença tem uma taxa elevada de letalidade em indivíduos imunocomprometidos, neonatos e fetos, com um desfecho fatal em até 30% dos casos (WATSON, 2009).

Entre os sorotipos associados à listeriose, as cepas pertencentes ao sorotipo 4b causam mais de 50% dos casos em todo o mundo e as cepas do grupo antigênico 1/2 (1/2a, 1/2b e 1/2c) predominam em isolados de alimentos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). Isto sugere que cepas sorotipo 4b são mais adaptadas aos tecidos do hospedeiro mamífero do que cepas dos sorogrupos 1/2. Alguns clones de *L. monocytogenes* podem

ser particularmente patogênicos, como o responsável por grandes surtos de listeriose de origem alimentar na Califórnia-EUA, em 1985, Suíça, de 1983 a 1987, Dinamarca 1985-1987, e França em 1992 composto por grupo de cepas do sorotipo 4b intimamente relacionadas fenotípica e genômica (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Wiedman e colaboradores (1997) encontraram uma correlação entre os três ramos evolutivos nos quais sorotipos de *L. monocytogenes* podem ser agrupados e o potencial patogênico para humanos e animais: cepas dos sorotipos 1/2b e 4b contêm todos os isolados de epidemias humanas de origem alimentar (tabela 1) e isolados de casos esporádicos em humanos e animais; cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a contêm cepas de casos humanos e de animais, mas não isolados de surtos humanos de origem alimentar; cepas do sorotipo 4a contêm somente isolados de animais.

A sorotipagem não tem muito valor para a vigilância epidemiológica porque discrimina apenas 12 sorotipos, muitos dos quais representam grupos de cepas geneticamente diversas. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - *pulse field gel electrophoresis*) pelo alto poder discriminatório, é considerada mais discriminatória para a vigilância epidemiológica, mas apresenta difícil padronização interlaboratorial. Baseado no PFGE associada a multilocus enzima eletroforese (MLEE), duas linhagens genéticas foram inicialmente identificadas (I e II); uma terceira linhagem (III) foi identificada com base na variação de genes de virulência, ribotipagem, e arranjos de DNA (BROSCH, et al., 1994; DOUMITH, et al., 2004; WIEDMANN, et al., 1997). A linhagem I inclui os sorotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e e 7, a linhagem II os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e a linhagem III os sorotipos 4a e 4c (COSSART, 2011).

Tabela 1: Surtos alimentares internacionais de listeriose invasiva (1980 – 2005)

Ano	Local	Nº de Casos	Casos Perinatais	Nº de Mortes	Veículo implicado/suspeito	Sorotipo
1981	Nova Escócia – CA	41	34	18	Salada de repolho	4b
1983	Massachusetts – EUA	49	7	14	Leite pasteurizado	4b
1985	Califórnia – EUA	142	94	48	Queijo estilo mexicano	4b
1983 - 1987	Suíça	122	65	34	Queijo VacherinMont d’Or	4b
1987 - 1989	Reino Unido	366	?	?	Patê	4bx
1989 - 1990	Dinamarca	26	3	7	Queijo Blue mold	4b
1992	França	279	0	85	Língua de Porco em geleia	4b
1993	França	38	31	10	Rillettes	4b
1998 - 1999	Vários estados – EUA	108	?	14	Cachorro-quente	4b
1999	Finlândia	25	0	6	Manteiga	3a
1999 - 2000	França	10	3	3	Rillettes	4b
1999 - 2000	França	32	9	10	Língua de Porco em geleia	4b
2000	Vários estados – EUA	30	8	7	Carnes de peru prontas pra consumo	1/2a
2000	Carolina do Norte – EUA	13	11	5	Queijo mexicano estilo caseiro	4b
2002	Vários estados – EUA	54	12	8	Carnes de peru prontas pra consumo	4b
2002	Quebec – CA	17	3	0	Queijos feitos de leite cru	
2003	Texas – EUA	12	?	?	Queijo estilo mexicano	4b

Fonte: Adaptada de SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007.

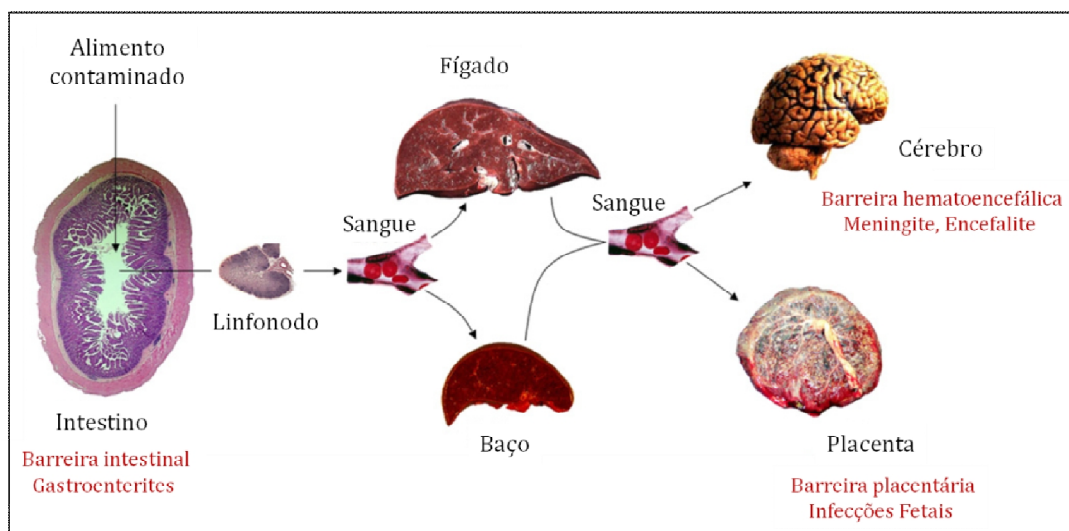
Legenda: ? - Desconhecido

3.2.1 Patogenicidade de *Listeria monocytogenes*

Após a ingestão de alimento contaminado, *L. monocytogenes* atravessa o epitélio intestinal e se dissemina através da corrente sanguínea e linfática atingindo os tecidos mais profundos (Figura 2). O fígado e baço são os órgãos alvo primários para a multiplicação bacteriana, resultando na formação de abscessos. Um aspecto característico da fisiopatologia de *L. monocytogenes* é a sua capacidade de atravessar as duas maiores barreiras epiteliais, a barreira hematoencefálica e a barreira placentária (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008).

L. monocytogenes é uma bactéria invasiva, que pode entrar numa grande variedade de células e passar, em seguida, diretamente de uma célula infectada para uma célula adjacente. Abordagens moleculares e de biologia celular revelaram que *L. monocytogenes* possui um arsenal elaborado de fatores de virulência funcional ou estruturalmente semelhantes às proteínas do hospedeiro para assim, utilizar o processo celular em benefício próprio. Durante as diferentes etapas de seu ciclo de vida intracelular, *L. monocytogenes* utiliza várias cascatas de sinalização celular do hospedeiro (STAVRU et al., 2011).

Figura 2 - Etapas da infecção por *Listeria monocytogenes*



Fonte: Adaptado de LECUIT, 2007.

3.2.1.1 Adesão e invasão celular

A entrada de *L. monocytogenes* em células não fagocíticas é mediada por duas proteínas de superfície bacterianas, InlA e InlB que pertencem à família de proteínas com repetições ricas em leucina chamadas internalinas (BIERNE et al., 2007; GAILLARD et al., 1991). InlA é uma proteína de superfície com um motivo LPXTG (leucina – prolina, treonina - glicina) que permite a ancoragem covalente ao peptídeooglicano, enquanto InlB interage de

forma não covalente com ácidos lipoteicóicos. InlA e InlB se ligam à proteínas específicas na superfície na célula do hospedeiro: InlA se liga a proteína de junção E-caderina (MENGAUD et al., 1996), e InlB tem como alvo o receptor tirosina quinase Met (SHEN et al., 2000). A ligação de InlA e InlB aos receptores não ocorre nos mesmos sítios que seus ligantes endógenos, mas leva ao recrutamento de um conjunto de moléculas de sinalização semelhante. A ligação de InlA e InlB aos seus receptores resulta em ubiquitinação do receptor, recrutamento de clatrina, rearranjo do citoesqueleto, e por fim, a captação do patógeno (BIERNE; COSSART, 2006; BONAZZI; COSSART, 2006; MOSTOWY; COSSART, 2009; IRETTON, 2007). A ligação de InlA e InlB aos receptores celulares também induz a montagem de plataformas de sinalização de multicomponentes, levando a ativação de vias celulares chave, como fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), PI4-quinases tipo II e proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) (PIZARRO-CERDA et al., 2007; SHEN et al., 2000). Como um resultado da expressão de Met, *L. monocytogenes* é capaz de infectar uma grande variedade de células humanas *in vitro*. Além disso, esse patógeno pode invadir diferentes hospedeiros eucariotos, mas a eficiência de infecção depende estritamente da espécie do hospedeiro (KHELEF et al., 2006; LECUIT, et al., 1999). A entrada nas células do hospedeiro permite que *L. monocytogenes* escape das funções de vigilância do sistema imune (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a).

Os estudos sobre os mecanismos empregados na travessia da barreira hematoencefálica são ainda escassos, destacando-se os trabalhos de Hertzog e colaboradores (2003) e Join-Lambert e colaboradores (2005). InlB é a única molécula com papel comprovado por estudos *in vitro* possivelmente envolvida (GREIFFENBERG et al., 1998; DREVETS, BRONZE, 2008) e o papel da E-caderina também é admitido, baseado na sua expressão pelo endotélio microvascular e células do plexo coróide que constituem a barreira hematoencefálica (LECUIT, 2005).

Depois da adesão à superfície celular, *L. monocytogenes* induz a sua própria captação através de um mecanismo de "zíper", que requer rearranjos do citoesqueleto e membrana além da proteína clatrina endocítica (VEIGA, COSSART, 2005). O recrutamento de clatrina parece preceder os rearranjos de citoesqueleto, essenciais para internalização da bactéria (VEIGA et al., 2007).

A internalina InlJ difere das demais por possuir um resíduo hidrofóbico-LRR em substituição a uma cisteína conservada. A porção C-terminal possui um motivo LPXTG que serve de âncora covalente a proteínas do peptidoglicano (SABET et al., 2005). O gene *inlJ* encontra-se apenas no genoma de *L. monocytogenes* e só é eficientemente expresso na

superfície de bactérias recuperadas a partir do fígado e sangue de animais infectados (SABET et al., 2008). A InlJ liga-se ao MUC2, o principal componente do muco intestinal através de seu domínio internalina (LINDÉN et al., 2008), atuando como uma adesina específica cuja expressão é induzida especificamente *in vivo* (SABET et al., 2008).

O gene *iap* codifica a p60, uma proteína de superfície com atividade mureína hidrolase sem a qual a célula bacteriana apresenta septos irregulares, tornando-se propensa a formar pequenos filamentos e células em forma de gancho durante a fase exponencial de crescimento. Na fase final de crescimento estacionário esses filamentos de células bacterianas anormais quebram-se em fragmentos de tamanho próximo ao de uma única bactéria (KUHN; GOEBEL, 1989; PILGRIM et al., 2003). A análise de mutantes espontâneos que perderam a capacidade de invadir fibroblastos de camundongos mostrou que a p60 é necessária para uma invasão bem sucedida das células do hospedeiro (KUHN; GOEBEL, 1989, RUHLAND et al., 1993). Estudos demonstraram que uma mutação no gene *iap* acarreta redução da invasividade em fibroblastos e células epiteliais (PILGRIM et al., 2003), no entanto, a capacidade de internalização celular e de se ligar a células Caco-2 (células extraídas de adenocarcinoma de cólon humano) por cepas *iap* mutantes é restaurada pela proteína p60 (HESS et al., 1995; PARK et al., 2000); a mutação no gene *iap* acarreta infecção atenuada das cepas inoculadas pela via intravenosa em camundongos, o que reforça a importância da p60 durante a infecção (PILGRIM et al., 2003).

3.2.1.2 Lise do fagossoma e replicação intracelular

Uma vez dentro da célula, *L. monocytogenes* é inicialmente envolvida por um vacúolo que tem um pH ligeiramente ácido (pH = 5,7-5,9) (GLOMSKI et al., 2002). Pela ação combinada de duas fosfolipases (PI-PLC, uma proteína de 33 kDa codificada pelo gene *plcA* e PC-PLC, uma proteína de 29 kDa codificada pelo gene *plcB*) e pela toxina formadora de poros listeriolisina O (LLO, uma proteína de 58 kDa codificada pelo gene *hly*), a bactéria desestabiliza a membrana vacuolar, impedindo sua fusão com o lisossoma e levando a um rápido escape do vacúolo. Um importante fator na célula hospedeira que contribui para o escape do fagossoma é a enzima gama interferon induzível redutase tiol lisossomal (GILT) (PORTNOY et al., 1992; SINGH et al., 2008). Esta proteína ativa LLO, reduzindo sua cisteína, que promove a atividade de formação de poros de LLO, levando a um eficiente escape bacteriano. Embora GILT não participe da invasão do epitélio intestinal, parece essencial para estabelecer a infecção, por permitir o escape rápido do fagossoma em macrófagos que têm atividade antimicrobiana elevada. Uma vez no citosol, *L. monocytogenes*

precisa adaptar o seu metabolismo para o meio intracelular para se replicar eficientemente e utiliza para esse fim a glicose-1-fosfato, um intermediário da glicólise, disponível no citoplasma em grandes quantidades. A adaptação metabólica depende da expressão de vários genes, entre os quais o transportador de hexose fosfato (*hpt*), um sistema de captação de açúcar que é essencial para o crescimento bacteriano intracelular (CHICO-CALERO, et al., 2002). A expressão de *hpt* é regulada pelo ativador transcricional PrfA, que é ativado após a invasão da célula hospedeira (RENZONI et al., 1999). *L. monocytogenes* expressa fatores de virulência que interagem com e modulam proteínas do hospedeiro em diferentes fases da infecção. Esses determinantes bacterianos estão localizados na superfície bacteriana ou são secretados, com o objetivo de usar maquinaria biológica das células infectadas (BIERNE; COSSART, 2007).

3.2.1.3 Motilidade baseada em actina e propagação célula a célula

No citosol, *L. monocytogenes* expressa vários fatores de virulência, entre os quais o melhor caracterizado é a proteína de superfície ActA, que é crítica para o movimento intracelular e intercelular da bactéria e permite sua disseminação no hospedeiro. *L. monocytogenes* é capaz de recrutar o complexo de proteína relacionado à Actina 2/3 (Arp2 / 3) da célula hospedeira e a maquinaria de polimerização da actina de modo a formar uma estrutura chamada de "cauda de cometa" no polo posterior bacteriano (GOUIN et al., 2005; KOCKS et al., 1992). A actina é polimerizada exclusivamente em uma das extremidades da bactéria, uma vez que ActA se acumula de uma forma polar na superfície da célula após a divisão bacteriana (KOCKS et al., 1992). Isso permite uma propulsão unidirecional da bactéria através do citoplasma, um processo que é completamente independente da motilidade flagelar. Eventualmente, a motilidade de *L. monocytogenes* forma saliências sobre a membrana da célula hospedeira e, assim, se difunde para células vizinhas, sem induzir a lise celular, permitindo a bactéria se multiplicar sem estar acessível aos anticorpos produzidos pela resposta imune humoral do hospedeiro. A propagação célula à célula também desempenha um importante papel no cruzamento das barreiras materno-fetal e hemato-encefálica (DREVETS et al., 2001; ROBBINS et al., 2010).

A eficiente disseminação entre células epiteliais polarizadas requer a ação da proteína secretada InlC. Experimentos com inibidores de miosina II mostraram que essa proteína bacteriana causa perturbação nas junções celulares, sendo esse seu papel na formação da protrusão celular. Acredita-se que InlC promova a disseminação bacteriana diminuindo a

tensão cortical, aumentando assim a capacidade motora das bactérias pela formação de protrusões na membrana plasmática (RAJABIAN et al., 2009).

Em células infectadas secundariamente, *L. monocytogenes* escapa do vacúolo de membrana dupla para iniciar um novo ciclo de polimerização de actina e disseminação célula a célula. A lise do duplo vacúolo de membrana secundária ocorre através da ação conjugada de LLO e fosfolipases. É ainda desconhecido se a bactéria é capaz de detectar o vacúolo de membrana dupla e regular a expressão de seus genes de virulência nesse sentido, mas a fosfolipase PC-PLC é particularmente importante para a ruptura da membrana de duplo vacúolo (ALBERTI-SEGUI et al., 2007).

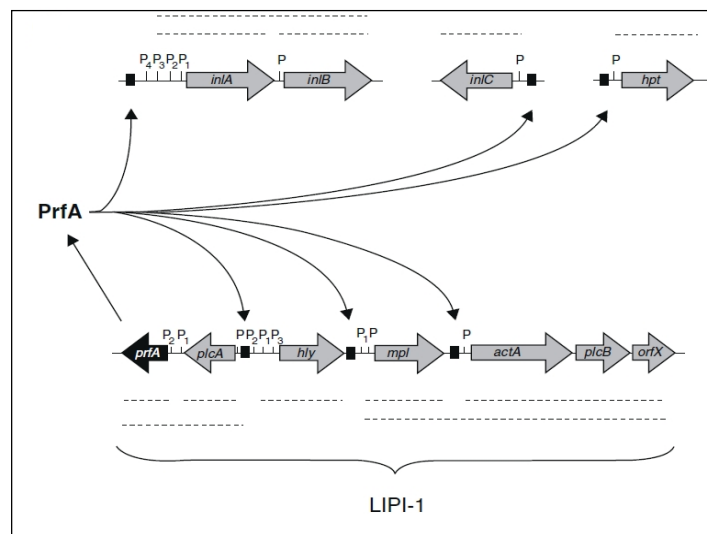
3.2.1.4 Regulação dos fatores de virulência

A adaptabilidade dos patógenos é crucial para o processo infeccioso e é determinada não apenas pelos fatores bacterianos que permitem a sobrevivência e multiplicação no interior dos tecidos, mas também pelos mecanismos necessários para uma rigorosa regulação e sua expressão. A região central do regulon PrfA é composta por dez genes de virulência identificados como os primeiros PrfA-dependentes (SCORTTI et al., 2007) (Figura 3), compreendendo a LIPI-1 (*Listeria pathogenicity island 1*), um *cluster* de genes de virulência de 9,6 kb, (GOUIN et al., 1994; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001b), além de mais três loci cromossômicos, o operon *inlAB* e os monocistrons *inlC* e *hpt* (DE LAS HERAS et al., 2011). Cepas de *L. monocytogenes* mutantes desprovidas de PrfA funcional são incapazes de crescer em células infectadas e são 100.000 vezes menos virulentas em camundongos do que cepas do tipo selvagem (FREITAG et al., 1993).

PrfA pertence a família de receptores de proteínas AMPc (Crp)/regulador fumarato nitrato redutase (Fnr) de fatores de transcrição bacterianos. Como a maioria dos membros dessa família, PrfA é um homodímero simétrico com promotores organizados em dois domínios principais (EITING, et al., 2005). O domínio N-terminal forma uma estrutura β -barril muito similar a do domínio de ligação de nucleotídeos cíclicos (SCORTTI et al., 2007). Esse módulo de sinalização é conservado em proteínas reguladas por nucleotídeos cíclicos e uma variedade de outras pequenas moléculas (KANNAN et al., 2007) o que sugere que PrfA é sujeito a ligação mediada por alosteria. O domínio C-terminal contém o motivo de ligação hélice-alça-hélice (HTH). O dímero PrfA ativa a transcrição por ligação a uma sequência de nucleotídeos palindrômica de 14 pares de bases, denominada box PrfA (consenso tTAACnntGTAA) localizada na posição 41.5 no promotor alvo (SCORTTI et al., 2007). Os principais determinantes de virulência são expressos a partir de promotores portadores de um

box PrfA consenso e são rigidamente controlados por PrfA. Além desse núcleo do regulon PrfA, a expressão de outros 160 genes de *L. monocytogenes* é influenciada por PrfA de acordo com análises proteômicas e de transcriptoma (MARR et al., 2006; MILOHANIC et al., 2003; PORT; FREITAG, 2007). Genes indiretamente regulados incluem codificadores de transportadores, enzimas metabólicas, reguladores e proteínas de função desconhecida (MARR et al., 2006; MILOHANIC et al., 2003). Assim, além do papel específico como regulador de virulência central, PrfA pode potencialmente exercer efeitos gerais sobre a homeostase de *L. monocytogenes* (DE LAS HERAS et al., 2011).

Figura3 - Organização esquemática do regulon PrfA



Fonte: DE LAS HERAS et al., 2011.

3.3. Métodos empregados na identificação e tipagem de *Listeria monocytogenes*

3.3.1 Detecção por sondas genéticas

Uma sonda para detecção de um gene é um trecho específico de ácido nucléico de cadeia simples que é marcado enzimaticamente ou radioativamente e empregado na identificação e detecção de uma sequência complementar de ácido nucléico num organismo alvo. A detecção de *L. monocytogenes* por sondas genéticas, tecnologia de detecção de ácido nucléico de primeira geração, é um método preciso e relativamente simples. O DNA da bactéria é fixado em um suporte (membrana de nitrocelulose ou membrana de náilon), hibridizado com uma sonda de gene específica, marcada enzimática ou radioativamente e detectado através de um substrato adequado (marcador de enzima) ou por autorradiografia (radiomarcador) (KLINGER et al., 1988; KOHLER et al., 1990). Este procedimento que explora as características genéticas entre as espécies de *Listeria* é mais específico do que

métodos bioquímicos e sorológicos, que se baseiam no fenótipo, no entanto, como não envolve a amplificação do ácido nucléico sua sensibilidade é limitada e requer pelo menos, 10^4 cópias do gene alvo por microlitro para detecção confiável. Desde a introdução das técnicas de amplificação de ácido nucléico, o emprego de procedimentos baseados em sondas de genes tem declinado (LIU, 2006).

3.3.2 Detecção por amplificação de ácido nucléico

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação *in vitro* de ácido nucléico empregada na detecção de segmentos de DNA específicos e entre as diversas abordagens da amplificação de ácidos nucléicos, foi a primeira técnica desenvolvida e continua sendo a mais empregada em laboratórios clínicos e de pesquisa, podendo ser útil no diagnóstico de patógenos bacterianos, além de identificar organismos cultiváveis e não cultiváveis. A PCR emprega dois iniciadores (geralmente com 20-30 nucleotídeos de comprimento) que ladeiam o início e o fim de uma sequência de DNA alvo, uma enzima DNA polimerase termoestável, que é capaz de sintetizar o DNA, e uma sequência de DNA dupla fita que funciona como um modelo para a síntese de DNA. O processo tem início a uma temperatura elevada (por exemplo, 94°C) para desnaturar e abrir o molde de DNA dupla fita em cadeia simples, seguido por uma temperatura relativamente baixa (por exemplo, 54°C), para permitir o reconhecimento e ligação entre o iniciador (*primer*) de cadeia simples e o DNA molde e em seguida, uma temperatura de 72°C para permitir a ação da DNA polimerase com a extensão do DNA. Todo o processo é repetido 25-30 vezes de modo a que uma única cópia do modelo de DNA pode se transformar em milhares de cópias dentro de três a quatro horas. Devido a capacidade de amplificar seletivamente alvos específicos presentes em baixas concentrações (teoricamente uma única cópia de molde de DNA), oferece excelente sensibilidade, especificidade e facilidade de execução na detecção laboratorial de *L. monocytogenes* a partir de amostras clínicas. Os produtos de DNA amplificados podem ser separados por eletroforese em gel de agarose e detectados com um corante de DNA, ou alternativamente detectados através de sondas marcadas, sequenciamento de DNA e outras técnicas relacionadas (MANZANO et al., 2000; WANG et al., 1993).

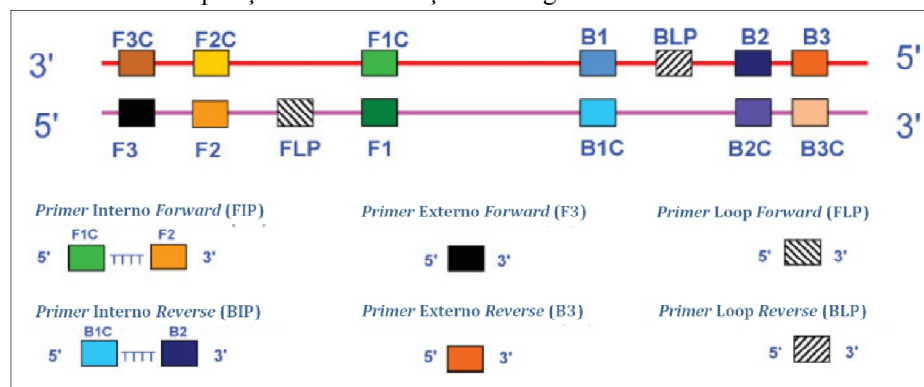
3.3.2.1 Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP)

Amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) é uma técnica de amplificação gênica que surgiu com a proposta de ser uma ferramenta rápida e simples de diagnóstico para a detecção precoce e identificação de doenças microbianas. O procedimento é simples e

rápido, uma vez que a amplificação pode ser completada em menos de uma hora sob condições isotérmicas empregando um conjunto de quatro a seis iniciadores específicos que abrangem de seis a oito sequências distintas de uma sequência alvo de DNA ou RNA, utilizando a enzima *Bst* DNA polimerase, responsável pela amplificação isotérmica do gene alvo a aproximadamente 63°C, o que possibilita que a reação seja realizada em Banho Maria, dispensando o uso de termociclador (MORI; NOTOMI, 2009; TOMITA et al., 2008). Os produtos de amplificação do gene podem ser detectados por eletroforese em gel de agarose ou mesmo visualizados a olho nu, através da turvação ou sob a forma de alteração de cor quando o SYBR Green, um corante fluorescente intercalante de DNA, é empregado (NOTOMI et al., 2000; PARIDA et al., 2008).

O desenho dos *primers* é uma etapa crítica para o desenvolvimento da reação, sendo baseado em oito regiões distintas no gene alvo: F3c, F2c, F1c, FLP, B1, B2, B3 e BLP (Figura 4). Para a reação de LAMP são requeridos dois *primers* externos - *primer* externo *forward* (F3) e *primer* externo *reverse* (B3) - ambos possuem papel na separação da dupla fita de DNA, dois *primers* internos - *primer* interno *forward* (FIP) e *primer* interno *reverse* (BIP) - possuem sequência complementar a fita molde de DNA e a fita em formação, o que possibilita a formação do *loop* e dois *loop primers*, facultativos na reação - *forward loop primer* (FLP) e *loop primer reverse* (BLP) - utilizados para acelerar a reação de amplificação por hibridizarem em sítios adicionais não acessados pelos *primers* internos, sendo suas sequências complementares as sequências entre as regiões F1 e F2 (FLP); B1 e B2 (BLP) (PARIDA et al., 2008).

Figura 4 - Representação esquemática dos seis primers usados na reação de LAMP mostrando as posições de hibridização com o gene alvo



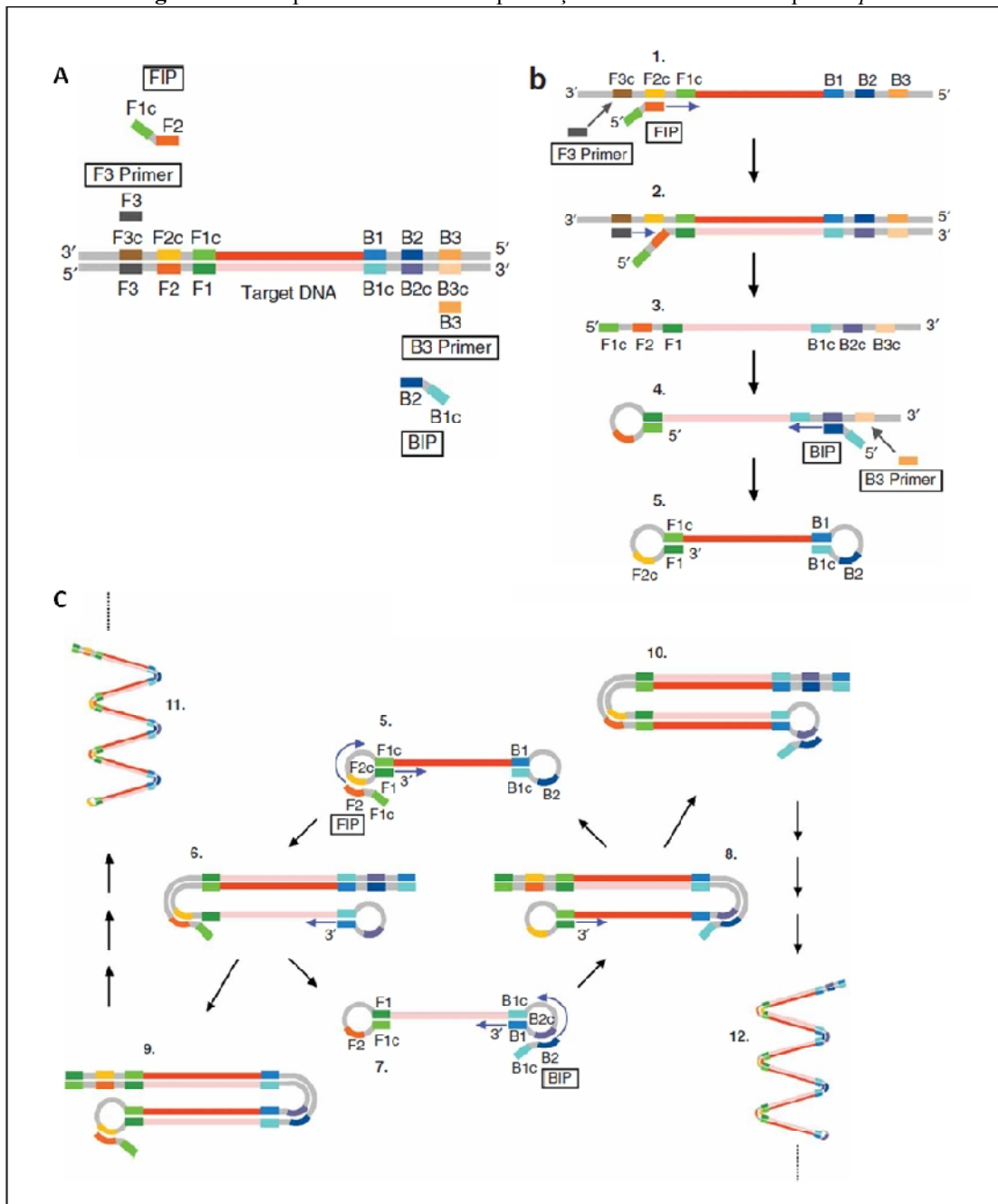
Fonte: Adaptado de PARIDA et al., 2008

O processo de amplificação é dividido em duas etapas: cíclica e não cíclica. Na etapa não cíclica (Figura 5), há formação de DNA com *loops* em cada extremidade, que serão utilizados como estrutura iniciadora para a amplificação durante a etapa cíclica do LAMP.

Inicialmente, a região F2 do *primer* FIP hibridiza a região F2c presente na fita molde de DNA e o processo de amplificação é iniciado pela Bst polimerase (Figura 5A). Como o DNA se encontra em dupla fita em condições de equilíbrio a 63°C, a síntese de DNA é realizada pela Bst DNA polimerase, enzima isolada do *Bacillus stearothermophilus* com atividade de abertura e liberação da fita simples de DNA (NOTOMI et al, 2000). Uma fita complementar ao DNA alvo é sintetizada, iniciando da porção 3' da região F2 do FIP. O *primer* F3 hibridiza na região F3c, externa ao FIP, no DNA alvo e inicia a separação da fita sintetizada, liberando a fita em formação. Posteriormente a fita simples de DNA liberada forma uma estrutura em formato de *loop* na extremidade 5' pela complementaridade de bases nas sequências das regiões F1 e F1c (Figura 5B). Essa fita simples será utilizada como molde para a síntese de DNA a partir do sítio de ligação do *primer* BIP e subsequente separação da fita sintetizada pelo *primer* externo B3, da mesma forma que foi descrita anteriormente com os *primers* FIP e F3, obtendo-se uma estrutura composta dos um *loop* em ambas as extremidades, que será utilizado como molde na etapa cíclica (Figura 5C). Nessa etapa ocorre amplificação exponencial das estruturas em forma de *loop*, pela ação dos primers internos que leva a produção de aproximadamente 10^9 cópias do gene alvo em menos de uma hora. Como resultado desse processo, estruturas de vários tamanhos são geradas (PARIDA et al., 2008).

O uso dos *loop primers* (Figura 6) é facultativo na reação, que pode ocorrer normalmente somente com o emprego dos dois primers internos e dois primers externos. No entanto, a reação é acelerada com o emprego dos *loop primers*, reduzindo o tempo de amplificação a um terço ou metade do tempo necessário para a amplificação sem os *loop primers* (PARIDA et al., 2008).

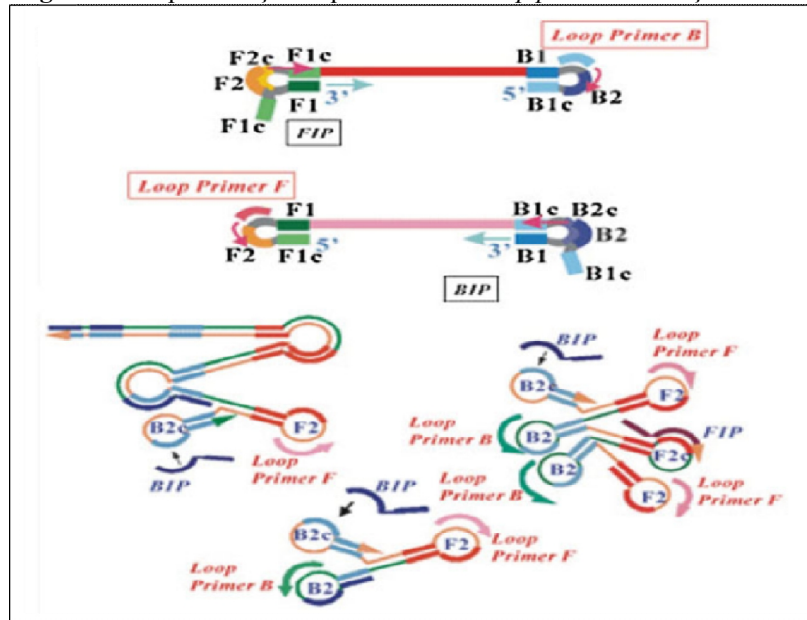
Figura 5- Princípio do método de amplificação isotérmica mediada por *loop*



Fonte: Adaptado de NOTOMI et al., 2008

Legenda: A - Ligação dos *primers* externos a sequência complementar na fita alvo de DNA. B - Ligação dos *primers* internos a sequência produzida pela amplificação com *primers* externos e formação das regiões em *loop* que possuem vários sítios de ligação para os *primers*. C - Estruturas de diferentes tamanhos são formadas pela amplificação pela técnica LAMP.

Figura 6 – Representação esquemática dos *loop primers* na reação LAMP



Fonte: PARIDA et al., 2008

3.3.3 Subtipagem

Como *L. monocytogenes* possui uma diversidade de cepas, a disponibilidade de métodos de subtipagem para rastrear cepas envolvidas em surtos de listeriose e análise genética de cepas de *L. monocytogenes* isoladas é parte integrante dos programas de controle e prevenção da listeriose. Similar à identificação das espécies, duas grandes abordagens de subtipagem são de uso comum: subtipagem fenotípica e genética ou molecular. Os métodos de subtipagem fenotípica incluem sorotipagem, fagotipagem e os métodos de subtipagem genética incluem PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*), ribotipagem, amplificação aleatória de segmento polimórfico de DNA (RAPD), polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP), polimorfismo de fragmentos de restrição de produtos de PCR (PCR-RFLP) e PCR de elemento repetitivo (REP-PCR) e técnicas de subtipagem baseadas em sequenciamento de DNA, como *multilocus sequence typing* (MLST). Enquanto a subtipagem fenotípica ocasionalmente apresenta baixa discriminação e reprodutibilidade, a subtipagem molecular é altamente sensível, discriminatória e reprodutível. A combinação de duas ou mais técnicas de subtipagem, sejam baseadas em fenótipo ou genótipo, é frequentemente usada na prática para investigação de surtos de *L. monocytogenes* (LIU, 2006).

3.3.4 Determinação de virulência

A disponibilidade de métodos laboratoriais para avaliar o potencial patogênico de *L. monocytogenes* é importante para o controle eficaz e prevenção da listeriose. Ao longo dos

anos, vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a virulência de cepas de *L. monocytogenes*. Estes incluem ensaios de virulência em camundongos, ensaios de células *in vitro*, e a detecção de proteínas e genes associados à virulência. Esses métodos não só tem contribuído para uma melhor compreensão da virulência e patogenicidade de *L. monocytogenes*, mas também ajudam a desenvolver medidas de controle adequadas contra a listeriose (LIU, 2006).

3.3.4.1 Ensaio de virulência em animais

O teste de virulência em camundongos é considerado o padrão ouro entre as provas de virulência de *L. monocytogenes* porque permite determinar o nível de virulência *in vivo* (LIU et al., 2003; NISHIBORI et al., 1995; PINE et al., 1991.; ROCHE et al., 2001). Modelos animais ideais precisam reproduzir uma infecção semelhante a que ocorre em humanos, levando a infecção ao desfecho de interesse, permitindo repetições que minimizem a incerteza relativa à variabilidade biológica e atendam às restrições econômicas, bem como às considerações éticas. Até o momento o conhecimento sobre as diferenças fisiológicas entre as espécies de animais tem levantado questões sobre a relevância da maioria dos modelos animais utilizados no estudo de doenças humanas (LECUIT, 2007; HOELZER et al., 2012) e ainda não foi estabelecido um modelo animal ideal para estudo da listeriose. A listeriose é tradicionalmente estudada em camundongos, um dos primeiros modelos usados para avaliação da virulência de *L. monocytogenes*, mas outros mamíferos como, primatas não humanos, cobaias e roedores também são ocasionalmente utilizados. A maioria dos estudos tem como foco a doença associada à gravidez ou infecção neonatal, mas também são realizados estudos sobre a septicemia em animais adultos não gestantes (HOELZER et al., 2012).

Os ensaios consistem em geral da inoculação de diversos grupos de animais com várias doses de diferentes diluições bacterianas através das vias oral, nasal, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea. A virulência de uma determinada cepa de *L. monocytogenes* é determinada pela mortalidade resultante da infecção, após a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) em placa de Agar, e é geralmente expressa como dose letal média (DL50) (LIU, 2006; WELKOS; O'BRIEN, 1994). Alternativamente, a virulência de uma dada cepa pode ser determinada pelo número de bactérias que atingem o baço após a infecção experimental (LIU, 2006).

3.3.4.2 Modelos de listeriose *in vitro*

O estudo de *L. monocytogenes* em modelos de infecção *in vitro* é favorecido pela capacidade da bactéria entrar e crescer rapidamente em uma ampla variedade de células em cultura de tecidos. No entanto, como um patógeno facultativo, também cresce em meios de cultura de tecidos e para evitar a replicação extracelular, a gentamicina (antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos) é adicionado às células infectadas após a internalização bacteriana. Uma concentração relativamente elevada de gentamicina tem ação bactericida para as bactérias extracelulares, mas não sobre *L. monocytogenes* intracelular (BRUNDAGE et al., 1993). No ambiente intracelular *L. monocytogenes* cresce com tempo de duplicação inicial de aproximadamente 40 minutos, que se aproxima da taxa de crescimento em meios enriquecidos (PORTNOY, 2002).

A associação entre a capacidade de adesão e/ou invasão e patogenicidade de isolados de *L. monocytogenes* para a célula hospedeira é estudada em linhagens de células (YAMADA et al., 2006). Várias linhagens (HEp-2 - linhagem de células tumorais derivadas de carcinoma laríngeo humano, Vero - células fibroblásticas renais de macaco verde da África e Caco-2) são apropriadas para a avaliação da adesão, invasão e virulência de *L. monocytogenes* (GAILLARD et al., 1987; KATHARIOU et al., 1990). Condições ambientais, como a temperatura de crescimento podem afetar a virulência de *L. monocytogenes* o que pode ser atribuído a termorregulação de genes de virulência (DRAMSI et al., 1993; LEIMEISTER-WACHTER et al., 1992).

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001 - Disponível em www.anvisa.gov.br, acesso em 12 de maio de 2012.
- ALBERTI-SEGUI C., et al. Differential function of *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phospholipases C in vacuolar dissolution following cell-to-cell spread. **Cellular microbiology**, Oxford, v.9, p.179–195, 2007.
- ALLERBERGER F, WAGNER M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 16, p. 16–23, 2010.
- BIERNE H, COSSART P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. **Microbiology and molecular biology reviews**, Washington , v. 71, p. 377–397, 2007.
- BIERNE H, et al.. Internalins: a complex family of leucinerich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and infection**, Paris, v. 9, p. 1156– 1166, 2007.
- BONAZZI M, COSSART P. Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery. **Febs letters**, Amsterdam, v. 580, p. 2962–2967, 2006.
- BROSCH, R., et al. Pulsed-Field Fingerprinting of Listeriae: Identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 60, p. 2584-2592, 1994.
- BRUNDAGE, R. A., et al. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, p. 11890-11894, 1993.
- BUCHRIESER, C., et al. Complete Genome Sequence of the Animal Pathogen *Listeria ivanovii*, Which Provides Insights into Host Specificities and Evolution of the Genus *Listeria*. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 193, p. 6787–6788, 2011.
- CHICO-CALERO, I., et al. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 431–436, 2002.
- COSSART, P. Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, p. 19484-91, 2011.
- COSSART, P., TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and infection**, Paris, v. 10, p. 1041-50, 2008.
- DE LAS HERAS, A., et al. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Current opinion in microbiology**, New York, v. 14, p. 118-27, 2011.

DEN BAKKER, H.C., et al. Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. **BMC genomics**, London, v. 11, p. 688, 2010.

DOUMITH, M. et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and immunity**, Washington, v. 72, p. 1072–1083, 2004.

DRAMSI, S., et al. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 9, p. 931–941, 1993.

DREVETS, D. A., BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS immunology and medical microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 151–165, 2008.

DREVETS, D. A., et al. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. **Infection and immunity**, Washington, v. 69, p. 1344–1350, 2001.

EITING, M., et al. The mutation G145S in PrfA, a key virulence regulator of *Listeria monocytogenes*, increases DNA-binding affinity by stabilizing the HTH motif. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 56, p. 433–446, 2005.

ERMOLAEVA, S., et al. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 82, p. 87–94, 2003.

FREITAG, N.E., et al. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. **Infection and immunity**, Washington, v. 61, p. 2537–44, 1993.

GAILLARD, J. L., et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. **Cell**, Cambridge, v. 65, p. 1127–1141, 1991.

GAILLARD, J. L., et al. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, p. 2822–2829, 1987.

GLOMSKI, I.J. et al. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. **Journal of cell biology**, New York, v. 156, p. 1029–1038, 2002.

GOUIN, E., et al. Actin-based motility of intracellular pathogens. **Current opinion in microbiology**, New York, v. 8, p. 35–45, 2005.

GOUIN, E., et al. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. **Infection and immunity**, Washington, v. 62, p. 3550–3553, 1994.

GRAVES, L.M., et al. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Reading, v. 60, p. 1280-8, 2010.

GREIFFENBERG, L, et al. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 66, p. 5260–5267, 1998.

GUILLET, C. et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 16, p. 136-8, 2010.

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

HERTZIG, T., et al. Antibodies present in normal human serum inhibit invasion of human brain microvascular endothelial cells by *Listeria monocytogenes*. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, p. 95–100, 2003.

HESS, J., et al. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. **Infection and immunity**, Washington, v. 63, p. 2047-53, 1995

HOELZER, K., et al. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. **Veterinary research**, Paris, v. 43, p. 18, 2012.

IRETON, K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 9, p. 1365–1375, 2007.

JACQUET, C. et al. Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 2, p. 616-622, 2002.

JOIN-LAMBERT, O.F., et al. *Listeria monocytogenes* infected bone marrow myeloid cells promote bacterial invasion of the central nervous system. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 7, p. 167–180, 2005.

KANNAN, N., et al. Evolution of allostery in the cyclic nucleotide binding module. **Genome biology**, London, v. 8, p. R264, 2007.

KATHARIOU, S., et al. Nonhemolytic *Listeria monocytogenes* mutants that are also noninvasive for mammalian cells in culture: evidence for coordinate regulation of virulence. **Infection and immunity**, Washington, v. 58, p. 3988–3995, 1990.

KHELEF, N., et al. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 8, p. 457–470, 2006.

KLINGER, J. D., et al. Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Washington, v. 71, p. 669–673, 1988.

- KOCKS, C., et al. *L. monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. **Cell**, Cambridge, v. 68, p. 521–531, 1992.
- KOHLER, S., et al. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. **Infection and immunity**, Washington, v. 58, p. 1943–1950, 1990.
- KUHN, M., GOEBEL, W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. **Infection and immunity**, Washington, v. 57, p. 55–61, 1989.
- LECLERCQ, A. et al. *Listeria rocourtiae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 2210–2214, 2010.
- LECUIT, M., et al. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **EMBO journal**, Oxford, v. 18, p. 3956–63, 1999.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and infection**, Paris, v. 9, p. 1216– 1225, 2007.
- LECUIT, M. Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 11, p. 430–436, 2005.
- LEIMEISTER-WACHTER, M., et al. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. **Journal of bacteriology**, Washington , v. 174, p. 947–952, 1992.
- LINDÉN, S.K., et al. *Listeria monocytogenes* internalins bind to the human intestinal mucin MUC2. **Archives of microbiology**, Berlin, v. 190, p. 101–104, 2008.
- LIU, D., et al. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 52, p. 1066–1070, 2003.
- LIU, D., et al. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 243, p. 373–378, 2005
- LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh ,v. 55, p.645–659, 2006.
- LIU, D., et al. *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Strains Belonging to Lineages I and III Possess Distinct Molecular Features. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 44, p. 214–217, 2006.
- MANZANO, M., et al. Temperature gradient gel electrophoresis of the amplified product of a small 16S rRNA gene fragment for the identification of species isolated from food. **Journal of food protection**, Iowa, v. 63, p. 659–661, 2000.

MARR, A.K., et al: Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 188, p. 3887-3901, 2006.

MENGAUD, J., et al. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, Cambridge, v. 84, p. 923–932, 1996.

MILOHANIC, E., et al. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 47, p. 1613-1625, 2003.

MORI, Y., NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *Journal of infection and chemotherapy*, Tokyo, v.15, pp.62–69, 2009.

MOSTOWY, S, COSSART, P. Cytoskeleton rearrangements during *Listeria* infection: clathrin and septins as new players in the game. **Cell motility and the cytoskeleton**, New York, v. 66, p. 816–823, 2009.

NISHIBORI, T., et al. Correlation between the presence of virulence associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. **Microbiology and immunology**, Tokyo, v. 39, p. 343–349, 1995.

NOTOMI, T., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, London, v. 28, p. E63, 2000.

PALUMBO, J. D., et al. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 41, p. 564–571, 2003.

PARIDA, M., et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. **Reviews in medical virology**, Chichester, v. 18, p. 407-21, 2008.

PARK, J.H., et al. Specific binding of recombinant *Listeria monocytogenes* p60 protein to Caco-2 cells. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 186, p. 35-40, 2000.

PILGRIM, S., et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, p. 3473- 84, 2003.

PINE, L., et al. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco- 2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. **Journal of clinical microbiology**, Washington , v. 29, p. 990–996, 1991.

PIZARRO-CERDA, J., et al. Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 9, p. 2381–2390, 2007.

PORT, G.C., FREITAG, N.E: Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, p. 5886-5897, 2007.

PORTNOY, D. A., et al. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and immunity**, Washington, v. 60, p. 1263–1267, 1992.

PORTNOY, D. A., et al. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. **Journal of cell biology**, New York, v. 158, p. 409–414, 2002.

RAJABIAN, T., et al. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. **Nature cell biology**, London, v. 11, p. 1212-8, 2009.

RAMASWAMY, V., et al. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Hong Kong, v. 40, p. 4-13, 2007.

RENZONI, A., et al. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 34, p. 552–561, 1999.

ROBBINS, J.R., et al. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. **PloS pathogens**, San Francisco, v. 6, p. e1000732, 2010.

ROCHE, S. M., et al. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 68, p. 33–44, 2001.

RUHLAND, G.J., et al. Cell surface location of *Listeria* specific protein p60 detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. **Journal of general microbiology**, London, v. 139, p. 609-616, 1993.

SABET, C., et al. The *Listeria monocytogenes* virulence factor InlJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. **Infection and immunity**, Washington, v. 76, p. 1368- 78, 2008.

SABET, C., et al. The LPXTG protein InlJ, a new internalin involved in *Listeria monocytogenes* virulence. **Infection and immunity**, Washington, v. 73, p. 6912-22, 2005.

SALIMNIA, H., et al. *Listeria grayi*: vancomycin-resistant, gram-positive rod causing bacteremia in a stem cell transplant recipient. **Transplant infectious disease**, Copenhagen, v. 12, p. 526-8, 2010.

SCHMID, M.W., et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and applied microbiology**, Stuttgart, v. 28, p. 1-18, 2005.

SCHONBERG, A., et al. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. **International journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 32, p. 279–287, 1996.

SCORTTI, M., et al. The PrfA virulence regulon. **Microbes and infection**, Paris, v. 9, p. 1196-1207, 2007.

SHEN, Y., et al. InlB dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. **Cell**, Cambridge, v. 103, p. 501–510, 2000.

- SINGH, R., et al. GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. **Nature**, London, v.455, p. 1244–1247, 2008.
- STAVRU, F., et al. Cell biology and immunology of *Listeria monocytogenes* infections: novel insights. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 240, p. 160-84, 2011.
- SWAMINATHAN, B., GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infections**, London, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001a.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and infection**, Paris, v. 3, p. 571–584, 2001b.
- VEIGA, E., et al. Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. **Cell Cell host microbe**, Cambridge, v. 2, p. 340– 351, 2007.
- VEIGA, E., COSSART, P. *Listeria* hijacks the clathrin- dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. **Nature cell biology**, London, v. 7, p. 894–900, 2005.
- WANG, R. F., et al. A 16S rRNA-based DNA probe and PCR method specific for *Listeria ivanovii*. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 106, p. 85–92, 1993.
- WATSON, R. Listeriosis remains a cause for concern in Europe. **BMJ (Clinical research ed.)**, London, v. 338, p. b319, 2009.
- WELKOS, S.; O'BRIEN, A. Determination of median lethal and infectious doses in animal model systems. **Methods in enzymology**, New York, v. 235, p. 29–39, 1994.
- WIEDMANN, M., et al. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and immunity**, Washington, v. 65, p. 2707–2716, 1997.
- WIEDMANN, M., et al. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in Ruminants. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1086-1090, 1996.
- YAMADA, F., et al. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 66, p. 96– 103, 2006.

Artigo 1

Title: Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical and food samples in Brazil

Running title: *Listeria monocytogenes* characterization

Authors: Nilma Cintra Leal^{1*}, Ana Paula Rocha da Costa^{1,2}, Carina Lucena Mendes-Marques¹, Natália Regina Souza da Silva¹, Deyse Christina Vallim³, Alzira Maria Paiva de Almeida¹, Ernesto Hofer³

¹Departamento de Microbiologia. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil. CEP: 50670-420. Telephone: 81 21012568.

²Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

³Departamento de Bacteriologia. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

***Corresponding author:** Nilma Cintra Leal. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Departamento de Microbiologia. Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE. Cidade Universitária, Recife, PE, Brazil. CEP: 50670-420. Telephone: 55 81 21012568. Fax: 55 81 21012647. Email: nilma@cpqam.fiocruz.br

Manuscrito a ser submetido a Current Microbiology

ABSTRACT

This work aimed to determine the virulence potential of Brazilian clinical and foodborne *Listeria monocytogenes* isolates, to assess a genetic relationship between them and to identify a virulence marker. Identification was confirmed by PCR amplification of the 23S rDNA and serotyping was performed by serology. The presence of known virulence genes (*inlAB*, *inlC*, *inlJ*, *hly*, *actA*, *iap*, *plcA*) and plasmid content were determined. The genetic relationship among the strains was assessed by 16S-23S rDNA internal spacer region (ITS) amplification and random amplification of polymorphic DNA (RAPD). Serotype distribution of the 135 isolates analyzed was as follows: 1/2a (23.7%); 1/2b (16.3%); 1/2c (13.3%), and 4b (46.7%); genes distribution was: *hly* and *inlJ* (100%) *inlAB* (93.3%); *actA* (90.4%); *iap* (80%); *inlC* (68.9%) and *plcA* (55.5%); 17.7% of the isolates harbored cryptic plasmids. ITS divided the 135 isolates into three ITS profiles and RAPD clustered 83 isolates into 11 profiles. No relationship was observed among the serotype, ITS or RAPD profiles and the origin of the isolates. Although no virulence marker was disclosed, the occurrence of the more pathogenic serotypes and the high frequency of the virulence genes among the strains highlighted the pathogenic potential of the *L. monocytogenes* strains occurring in Brazil.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, serotyping, virulence genes, plasmids, PCR-ribotyping, RAPD.

INTRODUCTION

Listeria monocytogenes is a facultative intracellular pathogen endowed with a complex mechanism for *in vivo* growth and cell-to-cell transmission [12]. The bacteria spread throughout intestinal epithelial cells and crossing the blood/brain barriers cause septicemia and meningoencephalitis mainly in immunocompromised individuals. In pregnant women, it can cross the feto-placental barrier leading to fetus death and abortion [17]. However, a new non-invasive form of listeriosis affecting immunocompetent individuals was reported [1]. So, a better understanding of the infection mechanisms and the causal agent is highly needed.

Since the 1980s, many human foodborne listeriosis outbreaks with high lethality (20-30%) have been reported worldwide. In Brazil, listeriosis is not a notifiable disease, so the cases are underreported and the number of cases remains unknown [4].

This work aimed to determine the virulence potential of Brazilian clinical and food originated *L. monocytogenes* isolates, to unveil a genetic relationship between them and to define a virulence marker. Although no virulence marker was disclosed, the high frequency of virulence genes among strains from the more pathogenic serotypes highlights the pathogenic potential of the *L. monocytogenes* strains occurring in Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial cultures

The study involved 135 epidemiologically unrelated *L. monocytogenes* strains isolated from 1975 to 2003 throughout Brazil and maintained at the *Listeria* Collection (Fiocruz-CLIST) from the Laboratory of Bacterial Zoonoses, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. Out of them 47 originated from clinical specimens and 88 from food. Ten

Listeria reference strains were used as controls: four from the Center of Disease Control (CDC-USA), three from the *Listeria* Collection of the Pasteur Institute (CLIP) and three from the American Type Culture Collection (ATCC).

The cultures were maintained on tryptose agar (Biobras) stubs at 4°C and for the study were reactivated by inoculation in BHI medium (Brain Heart Infusion broth, Biobras), incubated at 37°C for 24 h and plated onto 5% sheep blood agar to confirm purity and assess the hemolytic activity.

Serotyping

Serotyping was performed with polyclonal cross-adsorbed factor antisera against somatic and flagellar *Listeria* antigens according to the reference method described by Seeliger and Höhne [16].

Plasmid Extraction

Plasmid DNA was isolated following a protocol based on Birnboim and Doly [3]. Briefly, 1 mL of culture grown in BHI broth was centrifuged (12.000 rpm, 4°C, 10 min), supernatant discarded, and the pellet washed once with TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) pH 8.0. Added 100 µL of a lysis solution (25 mM Tris HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8,0, 4mg/mL lisozyme, 2% glucose); tubes were homogenized and incubated 10 min at room temperature added 200 µL of an alkaline solution (0,2 N NaOH, 1% SDS), tubes were homogenized by inverting 6x (very softly) and incubated 10 min on ice bath; added 150 µL sodium acetate 3M pH 4,8; tubes homogenized (very softly) by inverting 20x, incubated at least 30 min on ice bath, and centrifuged 10 min. 400 µL of supernatant transferred to a new tube and added 400

μL of phenol:chloroform:isoamil alcohol (25:24:01); homogenized by inverting 20x firmly but softly; centrifuged 5 min; supernatant discarded and added 02 volumes of ethanol (~900 mL); incubated -20°C 2 h or -80°C 30 min; centrifuged 10 min; supernatant vacuum aspirated and discarded; pellet was suspended with 10 μL TE (10:1) or 10 μL H₂O or 10 μL RNase (0,1mg/mL). Samples were electrophoresed in 0,6% agarose gel, 100 volts until the dye falling from the gel. Plasmid sizes are determined by comparison with *Escherichia coli* 39R861 known plasmids (147 kb, 63 kb, 35.8 kb, and 6.9 kb).

DNA extraction

DNA was extracted following a protocol based in Ausubel et al. [2]. In short: 1 mL of bacterial growth in BHI broth was centrifuged for 10 min at 14,000 rpm. The pellet was washed with 500 μL of TE 10:1 and 10 μL of 1% lysozyme; 10 μL of 0.5% proteinase K were added to each tube and incubated at 60°C for 20 minutes. 100 μL of STE (2.5% SDS, 0.25M EDTA, 10mM Tris pH 8.0) were added, tubes were incubated at 60°C for 15 minutes, maintained at RT for 5 minutes and transferred to ice bath for 5 minutes. 130 μL of sodium acetate 7.5M were added placed into ice bath for 15 minutes and centrifuged 3 minutes at 14.000 rpm. 700 μL of the supernatant were transferred to new tubes and 420 μL of isopropanol were added to each sample, incubated at -80°C for 30 minutes and centrifuged at 14.000 rpm for 10 minutes. Supernatant was discarded, the pellet DNA was vacuum dried and resuspended in 10 μL of 0.02% RNase A. DNA was quantified by comparison with a known amount of HindIII λ DNA (Sigma).

Detection of virulence genes by PCR

The presence of the *inlAB* [7], *inlC* and *inlJ* [13], *hly* [6], *actA* [7], *iap* and *plcA* [8] genes was assessed by PCR. The reactions were performed in a total volume of 25 μ L containing 20 ng of genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 μ M dNTP (Invitrogen), 1.5 mM $MgCl_2$, 20 pmol of each primer, and 1 U *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). Extra $MgCl_2$ (1.5 mM) was used for the *actA* gene PCR. Amplifications were performed in a Biometra thermocycler programmed for 30 cycles of 1 min at 92°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C and a final extension of 7 min at 72°C. Reactions included *L. monocytogenes* reference strains as positive controls, and a negative control containing all reagents but DNA. A total of 5 μ L of the PCR product was subjected to electrophoresis in a 1.5% agarose gel at 100 V for 60 min, stained with ethidium bromide (1.5 mg/mL) and digitalized (Kodak DS Digital Science) for analysis.

The amplified fragment of each gene was purified and sequenced in an ABI3100 sequencer (Applied Biosystems, USA). The consensus sequence of each gene based on the reference strain (*L. monocytogenes* 4b ATCC 19115) was compared with the published sequences deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Tool (BLASTn).

23S rDNA PCR typing

PCR amplification of the 23S rDNA was used to confirm the strains identification at genus level and was performed as described by Hudson et al. [6]. Reaction reagents and conditions was the same as described above.

16S-23S rDNA internal spacer region (ITS) amplification

ITS amplification was performed with primers and conditions as previously described by Kostman et al. [9].

Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing

The genomic relationship among the strains was assessed in 83 isolates by RAPD using the primer 5' GAGGACAAAG 3' as described by Leal et al. [10].

RESULTS

23S rDNA PCR typing

PCR amplification of the 23S rDNA was used to confirm the strains identification at genus level. The segment of the expected size for the 23S rRNA gene specific to *Listeria* genus (239 kb) amplified in all samples (data not shown) confirming the preliminary identification.

Serotyping

The 135 *L. monocytogenes* isolates were distributed among four serotypes (1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b) (table 1). The human isolates fitted only 1/2a (25.5%) and 4b serotypes (74.5%), both CSF and blood originated samples. Most of the samples (both CSF and blood originated) were serotype 4b (74.5%). In total (88) food originated samples were distributed evenly among the four serotypes: 1/2a (22.7%), 1/2b (25%), 1/2c (20.5%), and 4b (31.8%). The 1/2b serotype was found among meat originated samples only.

Plasmid content

Out of the 135 strains, 24 (17.7%) harbored cryptic plasmids sized from ~50 to ~147 kb: ~50 kb in 16.7% of the strains; ~63 kb in 66.7%; ~70 kb in 8.3%, and ~147 kb in 8.3% strains. Table 2 shows the distribution of plasmids and serotypes among the strains analyzed.

Presence of virulence genes

According to PCR amplifications with specific primers all the 135 strains harbored the *hly* and *inlJ* genes; 93.3% of them harbored the *inlAB* gene, 90.4% harbored the *actA* gene; 80% the *iap* gene; 68.9% the *inlC* gene and 55.5% harbored the *plcA* gene. Table 3 shows the distribution of the amplified genes by the source of the strains. A comparison of the amplified gene fragment sequences with public sequences revealed 97% to 100% identity, which confirms the identities of these genes. All the reference strains amplified accordingly all the segments expected for each gene (data not shown).

ITS typing

The amplification patterns allowed to distinguish three ITS profiles among the 135 *L. monocytogenes* isolates: R1 with fragments of 600, 650, 900 and 1000 bp; R2, with fragments of 600, 900 and 1000 bp; and R3 with fragments of 600, 750 and 800 bp (Fig. 1). 37% of the isolates fitted R1 profile; 55.6% the R2 profile and 7.4% the R3 profile (Table 4).

Clinical isolates were evenly distributed between R1 (49%) and R2 (51%) profiles only. Food isolates distributed into the three profiles, most of them clustered the R2 profile (58%) followed by R1 (30.7%) and R3 (11.3%). R3 profile was exclusive of food isolates.

RAPD

RAPD analysis was performed on 83 out of the 135 isolates. Fragments of 400-2000 bp were generated. According to the amplification patterns the 83 strains were clustered into 11 RAPD profiles named G1 to G11 (Fig. 2).

DISCUSSION

Most of the human listeriosis cases worldwide [13] and in Brazil [5] are caused by the serotypes 1/2a, 1/2b and 4b that are considered the most virulent. Accordingly *L. monocytogenes* strains analyzed in the present work fitted the serotypes 1/2a, 1/2b, and 4b the serotype 1/2c which is frequent in foods [17].

Human blood and CSF isolates were all serotypes 1/2a and 4b, food isolates distributed evenly among the four serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, and 4b, and meat originated samples were all 1/2b serotypes only (Table 2). These data could suggest that 1/2a and 4b serotypes are more pathogenic or probably more invasive in humans.

Curiously, until late in the 1980s, *L. monocytogenes* serotypes 4b and 1/2a were predominantly found in Brazil, and serotypes 1/2b and 1/2c emerged only in the 90s [5]. Introduction or spread of these serotypes (1/2b and 1/2c) is probably due to the increased foodstuff imports. [5]

The clonal relationship between the isolates was assessed by the 16S-23S rDNA ITS analysis. As expected, low diversity among the isolates was observed, for this is a conserved region in prokaryote genomes. Only three profiles were distinguished among the isolates and one of them (R3) was exclusive to food isolates.

Accordingly it was observed that R1 and R2 profiles occurred among the samples isolated earlier, since the 1970's, and R3 emerged only after 2001. This can be attributed to the higher number of samples analyzed due to the increased research of *L. monocytogenes* in foods from that year. Nappi et al. [14]) related a higher discrimination by the analysis of the 16S, 5S and 23S rDNA sequence plus the spacer regions using an automated ribotyping (RiboPrinter) system allowing distinguishing 13 profiles among 35 isolates.

In the present study higher discrimination was obtained by RAPD, and 11 profiles were distinguished among 83 isolates analyzed. In spite of this high profile diversity no connection could be established regarding the serotype, presence of virulence genes and origin of the isolate and we considered useless to analyze a larger number of strains.

Most of the isolates harbored all the virulence genes researched but no connection was observed among genes distribution and any strain characteristics. Differences in the virulence and pathogenicity of *L. monocytogenes* have been reported unrelated to genes distribution among serotypes; many known virulence genes were reported evenly distributed among virulent and avirulent listeria strains [11, 15]. Hence, the sole presence of virulence genes cannot be considered a virulence marker for *L. monocytogenes*.

Considering its high size one can assume that the 147 kb plasmid found in two strains in this work could carry and transmit antibiotic resistance genes. However, they were both from food origin. Therefore, they are not probably related to antibiotic resistance.

In conclusion, no relationship was found among source of the *L. monocytogenes* strains, ITS profiles, serotypes or virulence genes presence. No virulence marker was disclosed, for the sole presence of virulence genes cannot be considered a virulence marker. However, the high frequency of virulence genes among strains from the more pathogenic serotypes highlighted the pathogenic potential of the *L. monocytogenes* strains occurring in Brazil. The presence of these serotypes among the Brazilian strains analyzed evidence the need of tightening the surveillance of food industry particularly animal products by the public health authorities aiming to identify and remove these bacteria from the food chain which presence should be null complying with the Brazilian food safety policy that establish “zero-tolerance” for *L. monocytogenes* presence in 25 g of food.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was partly supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil and the Program for Technological Development in tools for Health – PDTIS/FIOCRUZ.

REFERENCES

1. Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L, Salmaso S 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N Engl J Med. 342:1236-1241.

2. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K 1987. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Associates/Wiley Interscience, New York.
3. Birnboim HC, Doly J 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513–1523.
4. Bueno VF, Banerjee P, Banada PP, José de Mesquita A, Lemes-Marques EG, Bhunia AK 2010. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. Int J Environ Health Res 20:43-59.
5. Hofer E, Reis CMF, Hofer CB 2006. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico. Rev Soc Bras Med Trop 39:32-37.
6. Hudson JA, Lake RJ, Savill MG, Scholes P, McCormick RE 2001. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. J Appl Microbiol 90:614-621.
7. Johnson J, Jinneman K, Stelman G, Smith BG, Lye D, Messer J, Ulaszek J, Evsen L, Gendel S, Bennett RW, Swaminathan B, Pruckler J, Steigerwalt A, Kathariou S, Yildirim S, Volokhov D, Rasooly A, Chizhikov V, Wiedmann M, Fortes E, Duvall RE, Hitchins AD 2004. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. Appl Environ Microbiol 70:4256-4266.
8. Kaur S, Malik SV, Vaidya VM, Barbuddhe SB 2007. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. J Appl Microbiol, 103: 1889-96.

9. Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ, Stull TL 1992. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. J Clin Microbiol 30:2084-2087.
10. Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, Almeida AM, Silva MJ, Mello DM, Seki LM, Hofer E 2004. Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. J Appl Microbiol 96: 447-454.
11. Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML 2003. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes. J Med Microbiol 52:1066-1070.
12. Liu D 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J Med Microbiol 55:645-659.
13. Liu D, Lawrence ML, Ainsworth AJ, Austin FW 2007. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. Int J Food Microbiol 118:101-115.
14. Nappi R, Bozzetta E, Serra R, Grattarola C, Decastelli L, Florio C, Caramelli M 2005. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in humans and ruminants and food products by serotyping and automated ribotyping. Vet Res Commun 29:249-252.
15. Roche SM, Gracieux P, Albert I, Gouali M, Jacquet C, Martin PM, Velge P 2003. Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun 71:3429-3436.

16. Seeliger HPR, Höhne K 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species.
In: Bergan T, Norris JR (eds) *Methods in Microbiology*, Academic Press Inc, London, 13:31-49.
17. Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.

Table 1. Distribution of the serotypes among the clinical and food originated *Listeria monocytogenes* isolates

Source	Serotype				
	½ a	½ b	½ c	4 b	Total
Human					
CSF ^a	10	-	-	27	37
Blood	2	-	-	8	10
Subtotal	12	-	-	35	47 (34.8%)
Food					
Meat	14	22	12	17	65
Dairy	1	-	3	8	12
Sweets	2	-	1	1	4
Pasta & meat	1	-	1	1	3
Fish	1	-	-	1	2
Ready-to-eat	1	-	1	-	2
Subtotal	20	22	18	28	88 (65.2%)
Total	32 (23.7%)	22 (16.3%)	18 (13.3%)	63 (46.7%)	135 (100%)

^a Cerebrospinal fluid

Table 3. Distribution of the genes amplified by PCR according to the source of the isolates

Source	Number genes amplified per strain (%)							Total
	<i>inlAB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>hly</i>	<i>actA</i>	<i>iap</i>	<i>plcA</i>	
Human								
CSF ^a	34	30	37	37	36	29	20	37
Blood	9	9	10	10	9	9	8	10
Subtotal								47
Food								
Meat	62	41	65	65	59	53	36	65
Dairy	10	5	12	12	9	6	6	12
Sweets	4	2	4	4	2	4	1	4
Pasta & meat	3	2	3	3	3	3	1	3
Fish	2	2	2	2	2	2	1	2
Ready-to-eat	2	2	2	2	2	2	2	2
Subtotal								88
Total	126	93	135	135	122	108	75	135
	(93.3%)	(68.9%)	(100%)	(100%)	(90.4%)	(80%)	(55.5%)	

^a Cerebrospinal fluid

Fig. 1 Representative rDNA 16S- 23S rDNA ITS profiles. Lane M: 100-bp DNA ladder (Amersham). Lanes 1 to 3: R1, R2 and R3 profiles

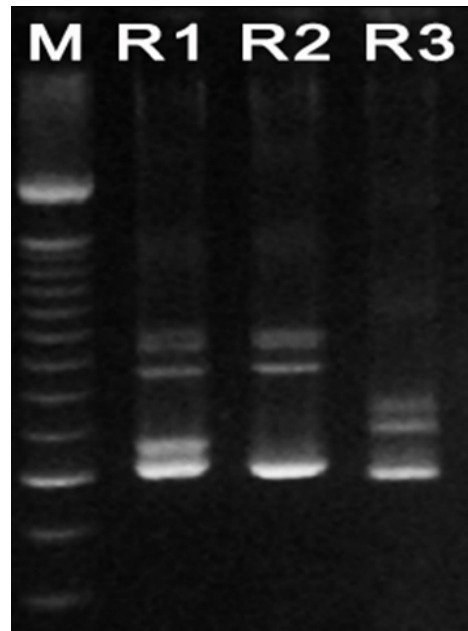
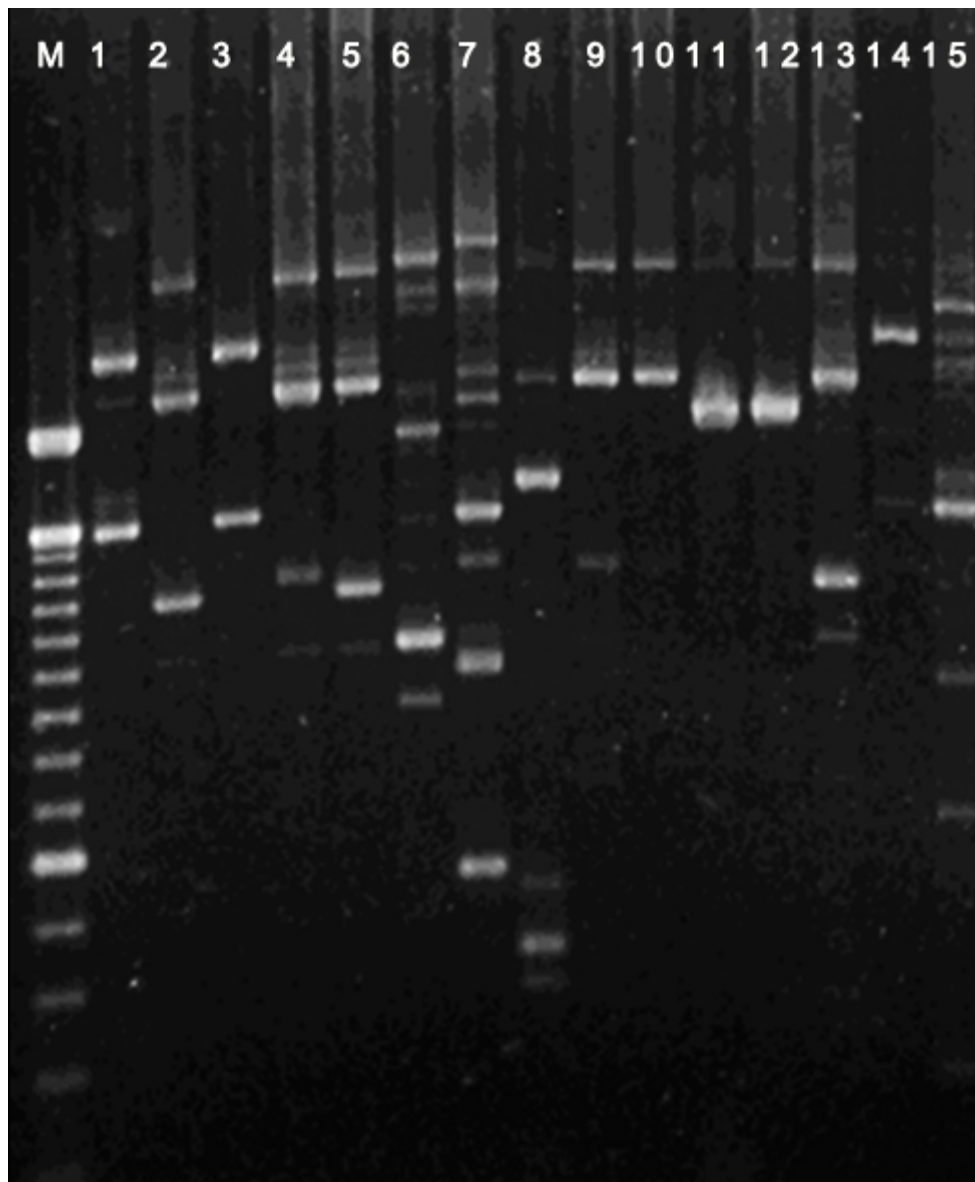


Fig. 2 Representative RAPD profiles of *Listeria monocytogenes* strains in 1.5% agarose gel. Lane M: 100-bp DNA ladder (Invitrogen). Lanes 1 and 3: G1; lane 2: G2; lanes 4 and 13: G3; lane 5: G4; lane 6: G5; lane 7: G6; lane 8: G7; lanes 9 and 10: G8; lanes 11 and 12: G9; lane 14: G10; and lane 15: G11.



Artigo 2

Avaliação de determinantes de virulência na patogenicidade de diferentes amostras de *Listeria monocytogenes*

Assessment of virulence determinants versus pathogenesis in *Listeria monocytogenes* from different sources

Running headline: Assessment of virulence determinants ...

Costa, A.P.R.^{1,2}, Ralph, M.T.³, Almeida, A.M.P.², Leal, N.C.², Lima-Filho, J.V.³

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brasil

²Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brasil

³Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brasil.

* *Corresponding authors*: José V. Lima-Filho, Laboratório de Microbiologia e Imunologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros s/n, Campus Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, CEP 52171-900, Brasil. E-mail: jvitor@db.ufrpe.br - Tel: + 55 31 81 3320.6312 - Fax: + 55 31 81 3320.6300; Nilma Cintra Leal, E-mail: nilma@cpqam.fiocruz.br

Manuscrito a ser submetido a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Resumo

O trabalho teve como objetivo avaliar o impacto de genes envolvidos em diferentes etapas da infecção na patogenicidade de cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b originadas de casos clínicos e alimentos portando deleção total de genes e uma deleção de 105 pb na sequência do gene actA (actAΔ). A patogenicidade das cepas foi avaliada pela mortalidade produzida após a infecção experimental em camundongos, pela contagem de UFC em sangue e tecidos de órgãos internos (baço e cérebro) e contagem total e diferencial de leucócitos. Não foi possível estabelecer uma relação entre a presença dos marcadores de virulência considerados no estudo e as respostas dos animais inoculados. Os resultados sugerem que outros fatores além dos analisados devem estar envolvidos na patogenicidade de *L. monocytogenes*. Como a maioria das infecções por *L. monocytogenes* resulta dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b pode-se especular que a virulência esteja mais relacionada às proteínas de superfície específicas desses sorotipos do que a fatores relacionados às etapas da infecção, mas os resultados obtidos também não permitem estabelecer esta associação. Outros estudos são necessários para elucidação dos fatores de patogenicidade de *L. monocytogenes*.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. Listeriose. Infecção animal. Virulência.

Introdução

Listeria monocytogenes é um bacilo Gram positivo e agente causador da listeriose, uma doença transmitida por alimentos potencialmente fatal. Após a introdução no organismo do hospedeiro, a bactéria atinge a corrente sanguínea e se dissemina inicialmente para o baço e fígado onde se multiplica e, por disseminação hematogênica, é capaz de translocar as barreiras placentária e hematoencefálica (Cossart e Toledo-Arana, 2008). As cepas de *L.*

monocytogenes apresentam diversos fatores de virulência relacionados ao escape da resposta imunológica, à adesão e invasão da célula hospedeira, à motilidade intracelular e propagação intercelular. Contudo, também podem ocorrer cepas avirulentas, cujos danos limitados provocam apenas sintomas subclínicos ao hospedeiro (Liu, 2006).

Dentre os doze sorotipos conhecidos de *L. monocytogenes*, três são considerados altamente virulentos (1/2a, 1/2b e 4b) e epidemiologicamente associados à maioria dos casos graves de listeriose em humanos. Contudo, o potencial patogênico de isolados de *L. monocytogenes* originados de amostras de alimentos é pouco esclarecido. Assim, vários marcadores moleculares têm sido utilizados para diferenciar patotipos virulentos e avirulentos. Por exemplo, a pesquisa dos genes *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *plcA*, *hly*, *iap* e *actA* em clones envolvidos com surtos epidêmicos, não relacionados temporal ou geograficamente, tem sido descrita (Chen *et al.*, 2007). Apesar disso, testes de virulência *in vivo* com animais de laboratório são considerados o “padrão ouro” para atestar o grau de virulência de cepas de *L. monocytogenes* (Liu *et al.*, 2003; Nishibori *et al.*, 1995; Pine *et al.*, 1991.; Roche *et al.*, 2001).

Em estudos anteriores, foi demonstrado que uma deleção de 105 pares de base na sequência do gene *actA* no sorotipo 4a de *L. monocytogenes*, reduz a disseminação intercelular e letalidade de camundongos infectados experimentalmente (Chakraborty *et al.*, 1994), mas não em cepas do sorotipo 1/2b (Chen *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar influência da presença / ausência de genes envolvidos em diferentes etapas da infecção por cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b, provenientes de diferentes fontes, em camundongos Swiss.

Material e métodos

Cepas de *L. monocytogenes*

Três cepas de *L. monocytogenes* 4b originadas de alimentos e duas originárias de casos clínicos, sendo duas (612 e 619) com deleção de 105 pb na sequência do gene *actA* (*actAΔ*), além de duas cepas de referência (*L. monocytogenes* 4b CDCF4555 e ATCC 19115), foram utilizadas no presente estudo. Ainda, uma cepa de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2c e uma de *L. ivanovii* (ATCC 19119) foram utilizadas. Todas as bactérias foram obtidas no Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e conservadas em Ágar camada alta, no Departamento de Microbiologia do CPqAM – FIOCRUZ-PE. A caracterização molecular de todas as cepas foi realizada em estudos anteriores e está descrita na Tabela 1.

Preparo dos inóculos

As bactérias foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Biobras) e incubadas a 37°C por 18h. A seguir, foram plaqueadas em agar Listéria e incubadas por 24 h a 37°C. Colônias foram obtidas das culturas puras e homogeneizadas em PBS pH 7,2 estéril para produzir suspensões contendo 10⁸ UFC/ mL, correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, ajustadas por espectrofotometria. Os inóculos bacterianos foram preparados diluindo-se 1: 10 (v:v) para obter uma suspensão final equivalente a 10⁷ UFC/ mL.

Infecção experimental com *L. monocytogenes*

Foram utilizados camundongos Swiss-Webster (30-35g) fornecidos pelo Biotério da FIOCRUZ-PE, que tiveram livre acesso a água e ração comercial (Purina, Paulínia, SP, Brazil). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia, da

Universidade Federal Rural de Pernambuco, e os animais foram manuseados de acordo com procedimentos aprovados pelo comitê de ética animal institucional (CEUA/ FIOCRUZ - LW-29/10). Os animais foram separados em grupos (n = 8) e inoculados, via intraperitoneal, com 0,2 ml de suspensão contendo o equivalente a 10^7 UFC/mL, seguindo protocolo adaptado de Lima-Filho et al. (2004). O grupo controle recebeu 0,2 ml de solução salina. Após o desafio infeccioso, os animais foram observados por 21 dias, sendo registrados diariamente os sintomas clínicos e mortalidade.

Análises

Clareamento de *L. monocytogenes*

Grupos de animais (n = 8) foram infectados com as cepas de *L. monocytogenes* de acordo com o protocolo acima descrito. Neste caso, os animais foram eutanasiados após 3 e 6 dias de infecção e amostras de sangue, baço e cérebro foram coletadas assepticamente. Os órgãos foram pesados e homogeneizados em PBS estéril e, posteriormente, submetidos a diluições decimais. Aliquotas de 0,1mL foram plaqueadas em Agar Listéria e as colônias foram contadas após incubação por 24 horas a 37°C. Os resultados foram expressos em CFU/g de órgão ou /mL de sangue.

Contagem total e diferencial de leucócitos

Foram preparados esfregaços de sangue para contagem de leucócitos e para diferenciação das células ao microscópio, de acordo com método descrito por Souza e Ferreira (1985). A contagem diferencial foi realizada a partir de esfregaço corado com Giemsa. Os resultados foram expressos em número de células $\times 10^3$ /mL de sangue.

Resultados

Os camundongos inoculados com as duas cepas de referência *L. monocytogenes* 4b (507, 508), que portam todos os genes de virulência analisados (*inlA*; *inlB*; *inlJ*; *inlC*; *hly*; *iap*; *plcA*; *actA*) e a cepa *L. ivanovii* (509), portando apenas os genes *inlA* e *inlB* sobreviveram às infecções. Por outro lado, as cepas 4b produziram diferentes índices de sobrevivência, após 21 dias de infecção, respectivamente: 224 (100 %), 212 (75 %), 612 (62,5 %), 211 (50 %) e 619 (0 %). Contudo, a cepa 198 de *L. monocytogenes* 1/2c, originada de alimento, portando os genes *inlA*; *inlB*; *inlJ*; *hly*; *iap*; *plcA*; *actA* foi responsável pelo maior índice de mortalidade (75%), no período de 1 a 4 dias após a infecção. O conjunto completo dos resultados é apresentado na Figura 1.

Todas as cepas de *L. monocytogenes* foram recuperadas no baço dos animais 3 e 6 dias após a infecção, com exceção da cepa 619, cujos animais não resistiram até o sexto dia (Fig. 2B). O índice de recuperação das bactérias no sangue foi variado, com número de unidades formadoras de colônias geralmente inferior a 10^4 UFC/ mL (Fig. 2A). Apenas as cepas 507, 224, 211, 508, 509 e 612 foram recuperadas no cérebro dos animais (Fig. 2C).

A tabela 2 mostra as contagens de leucócitos observadas no sangue dos animais infectados com as cepas 4b de alimentos ou isolados clínicos, que foram comparadas estatisticamente em relação às cepas de referência 507 e 508. De maneira geral, a cepa 212, isolada de alimento, induziu as mais altas contagens totais de leucócitos após 3 dias de infecção, representadas principalmente por linfócitos, de forma semelhante ao observado para a cepa 508. A cepa 612, isolada de caso clínico, induziu a segunda maior população de leucócitos após esse tempo, representada por populações balanceadas de linfócitos e neutrófilos. Já as cepas 619, 224 e 211 não induziram forte resposta inflamatória inicial. Os dados completos após 3 e 6 dias de infecção são mostrados na Tabela 2.

Discussão

A contagem do número de UFC a partir do sangue e de órgãos internos dos animais infectados experimentalmente permite avaliar a capacidade da cepa provocar bacteremia e atravessar a barreira hemato-encefálica, após atingir o baço. A recuperação de *L. monocytogenes* do baço dos animais é uma característica do processo de infecção desse microrganismo, pois o baço e o fígado são os órgãos primários para a multiplicação bacteriana após a entrada no organismo ocorrendo em seguida a disseminação hematogênica (Cossart; Toledo-Arana, 2008).

Neste trabalho foram usadas cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b originadas de casos clínicos e alimentos contendo genes de virulência responsáveis pela adesão e invasão (*inlA*, *inlB*, *inlJ* e *iap*), escape do vacúolo (*hly* e *plcA*) e dispersão bacteriana (*actA* e *inlC*); apresentando deleção total de alguns desses genes; e uma deleção de 105 pb na sequência do gene *actA* (*actAΔ*). A patogenicidade das cepas foi avaliada pela mortalidade produzida após a infecção experimental em camundongos e pela contagem de UFC em sangue e tecidos de órgãos internos (baço e cérebro).

As cepas de referência *L. monocytogenes* sorotipo 4b (507-CDC F4555 e 508-ATCC 19115) que possuem todos os genes de virulência analisados, e a cepa de referência *L. ivanovii* (509-ATCC 19119) conhecida como patógeno para ruminantes foram reisoladas do baço, sangue, cérebro dos animais o que significa que atravessaram a barreira hemato-encefálica, mas todos os animais se recuperaram e sobreviveram. Convém salientar dois aspectos da infecção por essas cepas: nas cepas *L. monocytogenes* sorotipo 4b a presença das bactérias nas amostras analisadas foi detectada apenas no 6º dia após a inoculação sugerindo evolução lenta do processo infeccioso; na cepa de *L. ivanovii* a redução das UFC no 6º dia revelando a evolução para recuperação dos animais.

A cepa 198, *L. monocytogenes* sorotipo 1/2c, apesar de possuir todos os genes de virulência analisados com exceção do gene *inlC*, que exerce um papel complementar ao gene *actA* atuando na disseminação intercelular, não foi capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica. Apesar disso o percentual de mortalidade atingiu 80% dos animais inoculados, sugerindo outro mecanismo de patogenicidade independente da infecção do SNC.

A cepa 224, *L. monocytogenes* 4b de origem clínica possui todos os genes de virulência analisados, foi isolada do baço, sangue e atravessou a barreira hemato-encefálica, mas não houve mortalidade e todos os animais sobreviveram.

Entre as duas cepas *L. monocytogenes* 4b com a deleção em *actA* (*actAΔ*) a cepa 619 isolada de caso clínico revelou-se a mais patogênica dentre as cepas estudadas inclusive as de referência (*L. monocytogenes* 4b CDC e ATCC). A cepa 619, teve o percentual de mortalidade mais alto e todos os animais morreram até o 2º dia, apesar da deleção em *actA* (*actAΔ*). A bactéria foi reisolada do sangue e baço dos animais, mas não foi isolada do cérebro sugerindo outro mecanismo de patogenicidade independente do comprometimento do sistema nervoso central (SNC). A cepa 612, isolada de alimentos, atingiu o baço e cérebro dos animais; UFC baixou no 6º dia após a inoculação (1,5 UFC/mL no 3º dia - < 1 CFU/mL no 6º dia); porém foi isolada do baço e cérebro até o 6º dia após a inoculação e a mortalidade foi de 40% dos animais infectados.

Semelhante ao observado por Chen e colaboradores (2009) em cepas do sorotipo 1/2b a deleção de 105pb no gene *actA* não reduziu a patogenicidade dessas cepas do sorotipo 4b ao contrário do observado nas cepas do sorotipo 4a em que essa deleção acarreta diminuição da virulência (Chakraborty et al., 1994).

A cepa 212 não possui os genes *inlB* e *iap* (envolvidos na invasividade celular), *inlC* (envolvido na disseminação intercelular) e *plcA* (envolvido no escape do vacúolo) mas matou 30% dos animais; encontrada em baixo número no baço (~1 CFU/grama de órgão) e não foi

encontrada no sangue nem no cérebro dos animais. A ausência daqueles genes pode ter acarretado a perda da capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica.

A cepa 211 não possui os genes *inlC*, *plcA* e *actA* foi encontrada no sangue, praticamente na mesma concentração no 3º e 6º dias após a inoculação. Apesar da falta dos genes relacionados ao escape do vacúolo (*plcA*), disseminação intercelular (*inlC*) e dispersão (*actA*) foi capaz de causar bacteremia, infectar o baço, atravessar a barreira hemato-encefálica e matar 50% dos animais inoculados. No 3º dia após a inoculação foi observado maior número de UFC no baço do que no cérebro e no 6º dia o contrário mais UFC no cérebro do que no baço, sugerindo maior tropismo da cepa para o sistema nervoso central (SNC).

Em conclusão, não foi possível estabelecer uma relação entre a presença dos marcadores de virulência considerados no estudo e as respostas dos animais inoculados. Uma cepa de *L. monocytogenes* 4b de origem clínica, e as de referência (CDC e ATCC) portando todos os marcadores contemplados apresentaram baixa virulência considerando que todos os animais sobreviveram semelhantemente à cepa de *L. ivanovii*, enquanto que uma cepa de *L. monocytogenes* 1/2c tido como um sorotipo menos virulento, além de deficiente quanto ao gene *inlC*, matou 70% dos animais. Entre os animais inoculados com as duas cepas deficientes em três (*inlC/plcA/actA*) ou quatro (*inlB/inlC/iap/plcA*) marcadores a mortalidade foi de 50 e 40% respectivamente, verificando-se o clareamento das bactérias nos baços dos animais pela contagem das UFC. Diferentes respostas foram observadas nos animais inoculados com as duas cepas com a deleção no gene *actA*: a de origem clínica revelou-se altamente virulenta com 100% mortalidade entre 1-2 dias e o SNC não foi atingido; e para a de alimento a mortalidade foi de apenas 40%, com as bactérias encontradas em sangue, baço e cérebro mas em baixa proporção de UFC/g tecido. Pela curva de sobrevivência dos animais inoculados pela via intraperitonal pode-se admitir que os genes *inlB*, *inlC*, *iap*, *plcA* e *actA* não são indispensáveis para a mortalidade de camundongos por *L. monocytogenes* 4b. Deve-

se considerar que as bactérias introduzidas por esta via de inoculação já tendo ultrapassado a barreira gástrica, dispensam alguns dos fatores necessários a esta etapa inicial do processo infeccioso. Esses resultados sugerem que outros fatores além dos analisados nesse estudo devem estar envolvidos na patogenicidade de *L. monocytogenes*. Como a maioria das infecções por *L. monocytogenes* resulta dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b pode-se especular que a virulência esteja mais relacionada às proteínas de superfície específicas desses sorotipos do que a fatores relacionados às etapas da infecção, mas os resultados do presente trabalho também não permitem estabelecer esta associação. Outros estudos são necessários para elucidação dos fatores de patogenicidade de *L. monocytogenes*.

Agradecimentos

FACEPE - Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

Referências

- Chakraborty T, Ebel F, Wehland J, Dufrenne J, Notermans S , 1994. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. FEMS immunol. med. microbiol. 10: 1-9.
- Chen J, Luo X, Jiang L, Jin P, Wei W, Liu D, Fang W 2009. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. Food microbiol. 26: 103-11.
- Chen Y, Zhang W, Knabel S J 2007. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. J. clin. microbiol. 45: 835–846.

Cossart P, Toledo-Arana A 2008. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes infect.* 10: 1041-50.

Lima-Filho JVM, Vieira LQ, Arantes RME, Nicoli JR 2004. Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. *Braz J Med Biol Res.* 37:1005-1013.

Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML 2003. Characterization of virulent and avirulent *Listeria monocytogenes* strains by PCR amplification of putative transcriptional regulator and internalin genes *J. medical microbiol.* 52: 1066–1070.

Liu D 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. medical microbiol.* 55: 645–659.

Nishibori T, Cooray K, Xiong H, Kawamura I, Fujita M, Mitsuyama M. 1995. Correlation between the presence of virulence associated genes as determined by PCR and actual virulence to mice in various strains of *Listeria* spp. *Microbiol. immunol.* 39: 343–349.

Pine L, Kathariou S, Quinn F, George V, Wenger J D, Weaver R E 1991. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco- 2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *J. clin. microbiol.* 29: 990–996.

Roche SM, Velge P, Bottreau E, Durier C, Marquet-van der Mee N, Pardon P 2001. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int. j. food microbiol.* 68: 33–44.

Souza, G E P, Ferreira S H 1985. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. Agents actions 17:1-5.

Tabela 1: Características das cepas analisadas

Identificação	Espécie Sorotipo	Ano	Fonte	Genes analisados							
				<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlJ</i>	<i>inlC</i>	<i>hly</i>	<i>iap</i>	<i>plcA</i>	<i>actA</i>
198	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c	1998	Alimento	+	+	+	-	+	+	+	+
211	<i>L. monocytogenes</i> 4b	1995	Alimento	+	+	+	-	+	+	-	-
212	<i>L. monocytogenes</i> 4b	1995	Alimento	+	-	+	-	+	-	-	+
224	<i>L. monocytogenes</i> 4b	1987	Caso clínico	+	+	+	+	+	+	+	+
612	<i>L. monocytogenes</i> 4b	2008	Alimento	+	+	+	+	+	+	+	var
619	<i>L. monocytogenes</i> 4b	1986	Caso clínico	+	+	+	+	+	+	+	var
507	<i>L. monocytogenes</i> 4b	NK	CDC F4555	+	+	+	+	+	+	+	+
508	<i>L. monocytogenes</i> 4b	NK	ATCC 19115	+	+	+	+	+	+	+	+
509	<i>Listeria ivanovii</i>	NK	ATCC 19119	+	+	-	-	-	-	-	-

NK: desconhecido; +: positivo; -: negativo; var: variado

Tabela 2 - Contagem total e diferencial de leucócitos em esfregaços sanguíneos de camundongos Swiss após desafio com cepas de *Listeria monocytogenes*

Strains		Total leukocyte (10 ³ cells/ mL)	Differential leukocyte cell count (10 ³ cells/ µL)				
			Eosinophil	Lymphocyte	Neutrophil	Monocyte	Basophil
3 days after infection	198	11.5 ± 1.54	0.11 ± 0.13	6.01 ± 1.30	4.81 ± 1.48	0.52 ± 0.07	0.0 ± 0.0
	212	9.73 ± 4.35	0.10 ± 0.0	7.06 ± 1.44	2.00 ± 1.45	0.46 ± 0.09	0.12 ± 0.09
	507	5.15 ± 3.65	0.0 ± 0.0	5.01 ± 0.15	0.62 ± 0.12	0.14 ± 0.09	0.04 ± 0.03
	619	3.05 ± 1.33	0.0 ± 0.0	1.58 ± 0.32	1.56 ± 0.29	0.01 ± 0.02	0.03 ± 0.0
	224	3.9 ± 0.34	0.0 ± 0.0	1.51 ± 0.32	2.27 ± 0.37	0.12 ± 0.05	0.0 ± 0.0
	211	3.5 ± 0.42	0.0 ± 0.0	2.00 ± 0.25	1.43 ± 0.98	0.07 ± 0.05	0.0 ± 0.0
	508	9.53 ± 0.30	0.0 ± 0.0	6.82 ± 0.20	2.48 ± 0.40	0.24 ± 0.20	0.0 ± 0.0
	509	3.12 ± 1.20	0.0 ± 0.0	1.25 ± 0.25	1.83 ± 0.21	0.05 ± 0.03	0.0 ± 0.0
	612	5.1 ± 0.53	0.0 ± 0.0	2.82 ± 0.20	2.13 ± 0.29	0.15 ± 0.12	0.0 ± 0.0
6 days after infection	198	8.85 ± 2.26	0.0 ± 0.0	5.93 ± 0.96	2.70 ± 1.14	0.20 ± 0.18	0.02 ± 0.04
	212	5.95 ± 0.53	0.0 ± 0.0	3.96 ± 0.85	1.68 ± 0.81	0.26 ± 0.07	0.04 ± 0.03
	507	7.60 ± 1.14	0.0 ± 0.0	6.09 ± 0.70	1.16 ± 0.59	0.15 ± 0.13	0.0 ± 0.0
	619	+	+	+	+	+	+
	224	6.4 ± 0.49	0.0 ± 0.0	2.18 ± 0.68	4.06 ± 0.68	0.16 ± 0.08	0.0 ± 0.0
	211	3.8 ± 0.28	0.0 ± 0.0	1.67 ± 0.59	2.07 ± 0.51	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	508	5.0 ± 0.35	0.0 ± 0.0	4.28 ± 0.07	0.62 ± 0.12	0.1 ± 0.05	0.0 ± 0.0
	509	7.25 ± 0.91	0.0 ± 0.0	2.92 ± 1.60	4.19 ± 1.70	0.14 ± 0.17	0.0 ± 0.0
	612	9.1 ± 0.48	0.0 ± 0.0	6.07 ± 1.20	2.89 ± 1.21	0.13 ± 0.12	0.0 ± 0.0
Healthy	Animals	1.30 ± 0.11	0.0 ± 0.0	5.48 ± 0.36	4.05 ± 0.73	0.92 ± 0.20	0.04 ± 0.04

+ Camundongos morreram antes das análises serem realizadas

Figura 1. Curva de sobrevivência dos camundongos após desafio com *Listeria monocytogenes*

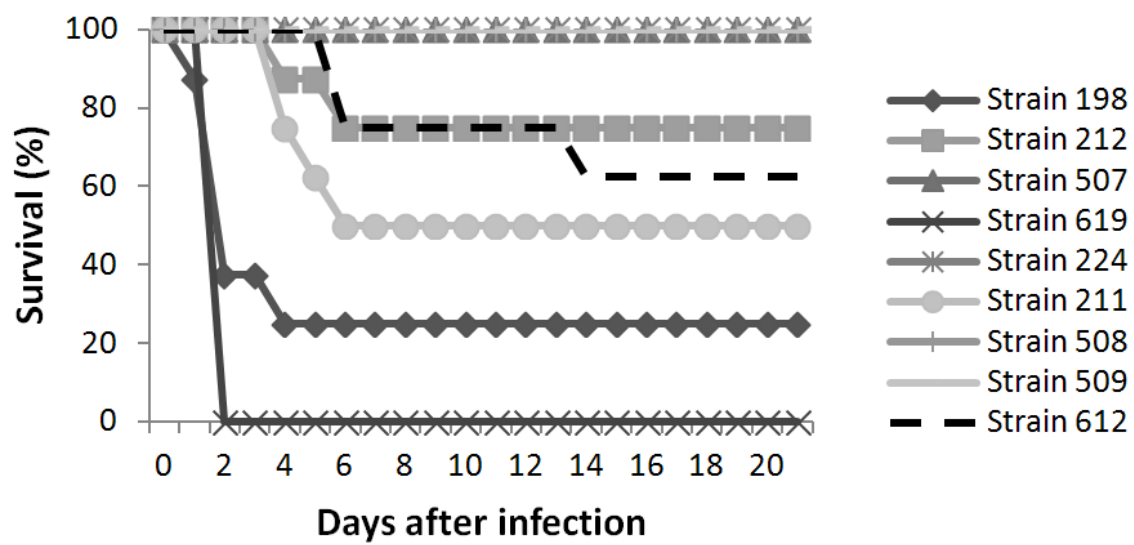
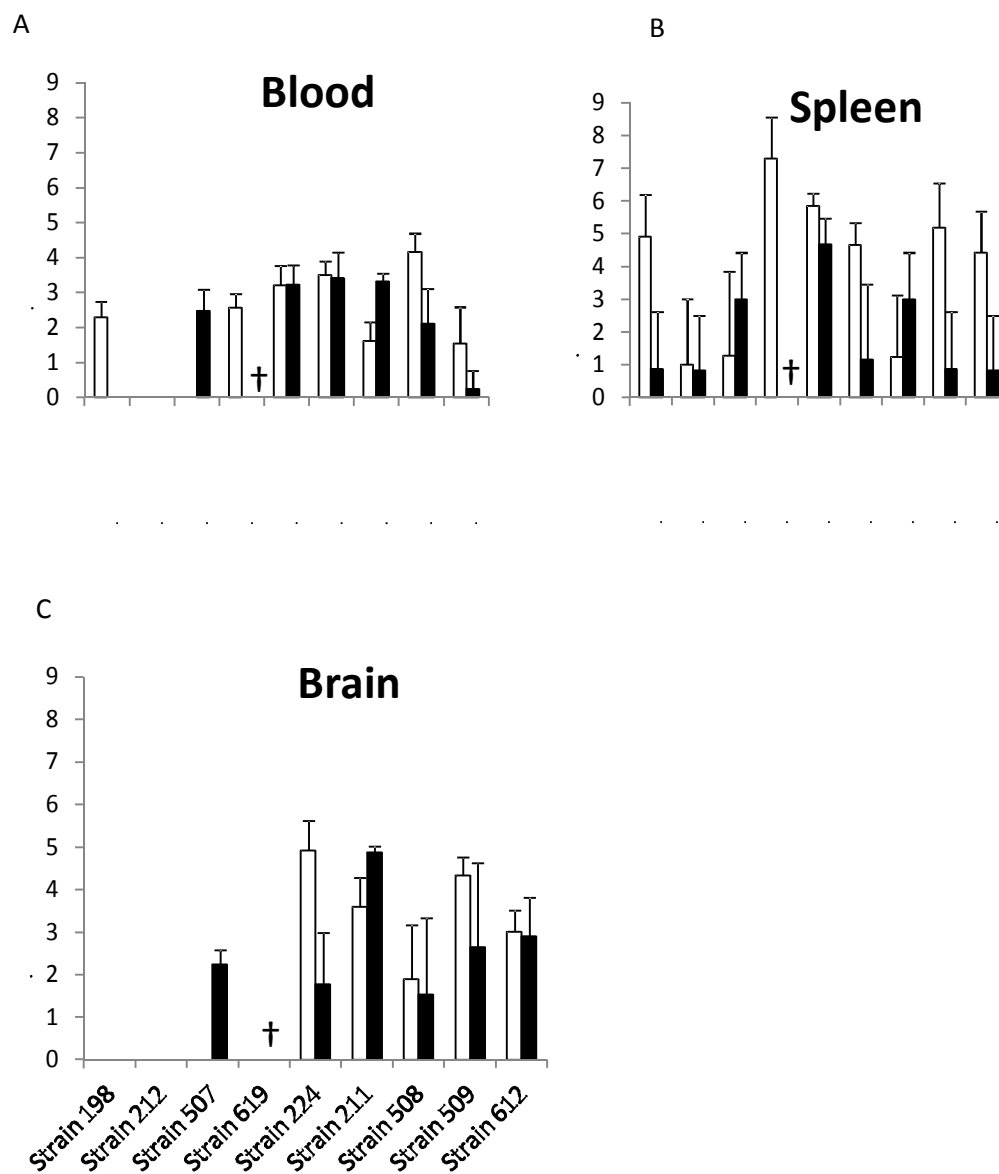


Figura 2. Número de unidades formadoras de colônias (CFU) de *L. monocytogenes* em sangue (blood) (A), baço (spleen) (B) e cérebro (brain) (C) de camundongos infectados e eutanasiados três dias após a infecção (barras brancas) e seis dias após a infecção (barras pretas).



Artigo 3

Characteristics of *Listeria monocytogenes* isolates from mitral heart valve bearing patient's blood culture

Authors: Ana Paula Rocha da Costa^{1,3*}, Marinalda Anselmo Vilela², Nilma Cintra Leal³, Alzira Maria Paiva de Almeida³

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

²Laboratório de Resistência Microbiana, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco, Rua Arnóbio Marques, 310, Recife, PE 50100-130, Brazil

³Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

Manuscrito submetido a The Scientific World Journal

***Corresponding author:** anaprcosta@yahoo.com.br

Telephone: 55 81 21012568. Fax: 55 81 21012647

Abstract

Six bacterial isolates from six blood cultures from a 28-year-old male bearing a mitral heart valve were analyzed by PCR using primers specific to *Listeria monocytogenes* to confirm a presumptive identification, determine the serotype and presence of genes involved in the three stages of the *Listeria* infection and to determine the *Listeria* genotype by PCR-ribotyping. The samples were identified as *L. monocytogenes* 4b. All of the virulence genes investigated were amplified by PCR, and the identity of the amplified segments was confirmed by sequencing. A deletion of 105 bp was detected in the *actA* gene. All samples generated the same PCR-ribotype pattern, clustered into a single ribotype, and were considered a single strain. Although uncommon, infection with *L. monocytogenes* should be considered in endocarditis differential diagnoses, especially among high-risk groups, due to its high pathogenicity and environmental ubiquity.

Introduction

Listeria monocytogenes is a gram-positive, coco-bacillus shaped, facultative intracellular pathogen that causes the disease listeriosis. It primarily affects pregnant women, newborns and immunocompromised adults, causing sepsis, abortion and infection of the central nervous system, resulting in high morbidity and mortality [1]. Out of the 13 recognized *L. monocytogenes* serotypes, three (1/2a, 1/2b and 4b) appear to be more pathogenic; they are epidemiologically associated with the most serious cases of human listeriosis [2].

In general, cardiovascular diseases, such as endocarditis and pericarditis, are associated with a poor prognosis and high mortality [3, 4, 5]. Endocarditis caused by *L. monocytogenes* infection often occurs in patients with defective or prosthetic heart valves, especially aortic and mitral valves [6, 7]. Mortality occurs in 100% of untreated cases; however, appropriate treatment reduces this rate to 20-30%, still higher than endocarditis caused by other bacteria, which are typically 14% lethal [4]. *L. monocytogenes* endocarditis is clinically diagnosed by symptoms associated with bacteremia, and treatment of infections is usually accomplished through administration of antibiotics, often ampicillin and an aminoglycoside [3]. Early identification of *L. monocytogenes* in endocarditis cases and determination of its antimicrobial sensitivity are crucial for the treatment of affected patients. However, *Listeria* is seldom suspected as the causative agent of endocarditis, and patient treatment is typically tailored for bacteria that are more frequently involved in endocarditis, such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus viridans*, *Enterococcus* and coagulase negative *Staphylococcus* (CoNS) [8]. Hence, the establishment of appropriate treatments may be delayed, aggravating the patient's condition and possibly leading to death, due to the high pathogenicity of *L. monocytogenes*.

This study analyzed six *L. monocytogenes* cultures obtained from a prosthetic mitral heart valve-bearing patient who presented at an emergency cardiology facility. The presumptive *Listeria* identification was confirmed by PCR at the genus, species and serotype level. The genomic profile of the organism was analyzed by PCR-ribotyping, *Listeria* virulence genes involved in the main host cells infection pathway were detected, and the antimicrobial susceptibility was assessed.

Material and methods

Bacteria isolation, presumptive identification and antimicrobial susceptibility assessment

Six blood cultures were obtained from a 28-year-old male, bearing a bovine pericardium mitral heart valve, whom presented to a cardiology emergency facility in Recife, PE, Brazil. Following clinical evaluation, three blood cultures were collected within 30 minute intervals; however, endocarditis or *Listeria* infection was not suspected, and the patient was released before the blood culture results were completed. Four days later, the patient entered the intensive care unit, for his condition had deteriorated. A second series of blood cultures was collected, and the patient was successfully diagnosed and treated, resulting in full recovery.

The bacterial growth after 24 hours incubation was initially identified as *Listeria* spp. by routine screening using standard bacteriological tests (colony morphology on blood agar plates, Gram staining and motility in semisolid medium). The antimicrobial susceptibility was determined by disk diffusion on agar plates according to CLSI [9].

The reference strains CIP12612 (*L. innocua*, negative control), CDC F4561 (*L. monocytogenes* 1/2a), CDC F4976 (*L. monocytogenes* 1/2b) and ATCC 19115 (*L. monocytogenes* 4b, positive control) were used.

DNA extraction

The DNA samples were extracted following a protocol based on Ausubel et al. [10], with minor modifications. Briefly, 1 ml of each bacterial culture in brain heart infusion broth (BHI, Biobras) was centrifuged for 10 minutes at 14,000 rpm, the pellet was washed with 500 µL of Tris:EDTA (10:1), and 10 µL of 1% lysozyme and 10 µL of 0.5% Proteinase K were added. The samples were incubated at 60°C for 20 minutes, then 100 µL of STE (2.5% SDS, 0.25 M EDTA, 10 mM Tris pH 8.0) was added. The samples were then incubated at 60°C for 15 minutes, at room temperature for 5 minutes and in an ice bath for 5 minutes. Then, 130 µL of 7.5 M sodium acetate was added, and the samples were reincubated in an ice bath for 15 minutes and centrifuged for 3 minutes at 14,000 rpm. At this point, 700 µL of the supernatant was transferred to a new tube, 420 µL of isopropanol was added, and the samples were incubated at -80°C for 30 minutes and centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded, and the pellet DNA was vacuum dried and resuspended in 10 µL

of 0.02% RNase. The yield of DNA was quantified by comparison with known amounts of λ HindIII DNA (Sigma).

PCR identification: genus, species and serotyping

To confirm the identification of the culture, specific primers were used in PCR reactions for amplification of the 23S rRNA gene from the *Listeria* genus [11] and *lmo* 2243 for *L. monocytogenes* species [12]. The serotype was assessed using primers specifically directed to the three most pathogenic serotypes: *lmo* 0737 for 1/2a [12], *gltB* for 1/2b [13] and ORF2110 for 4b [14]. The reaction mixtures were prepared in 25 μ L volume including 20 ng of genomic DNA, 50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH 8.0), 200 mM dNTP (Invitrogen) and 15 mM MgCl₂, 20 pM of each primer and 1U *Taq* DNA polymerase (Promega). Amplifications were performed in a Biometra thermocycler programmed for 30 cycles of 1 min at 92°C, 1 min at 55°C, 1 min at 72°C and 7 min final extension at 72°C. As negative control, a tube containing all reagents but genomic DNA was used in each reaction.

Detection of virulence genes

The presence of virulence genes involved in the three stages of the infection was assessed by PCR under the conditions described above using specific primers detecting *inlA* [15], *inlB* [16], *inlC* [17] and *inlJ* [17] involved in the host cells adhesion and invasion; *hly* [11]; *plcA* [18] involved in the vacuole escaping; *actA* [19] involved in the intracellular propagation; and the virulence genes regulator, *prfA* [18].

Each amplified gene segment was purified and sequenced in an automated sequencer ABI3100 (Applied Biosystems, USA). The consensus sequence for each gene was compared with published sequences available in the GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> using the Basic Local Alignment Tool (BLASTn). Multiple alignments were performed by Mega 4 [20].

PCR-ribotyping

Ribotyping was performed by PCR using specific primers for amplification of the intergenic spacer region 16S-23S rDNA as described [21].

Results

Antimicrobial susceptibility

All samples revealed sensitivity to ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, penicillin, rifampin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole and vancomycin and resistance to ceftiofur, by agar disk diffusion.

Determination of the genus, species and serotype by PCR

The segments of the expected size for the 23S rRNA gene specific to *Listeria* genus (239 bp), lmo2234 specific to *L. monocytogenes* species (420 bp) and ORF2110 specific to serotype 4b (597 bp) were amplified in all samples (data not shown) and were thus determined to be *L. monocytogenes* serotype 4b. *lmo* 0737 for 1/2a and *gltB* for 1/2b did not amplify.

Virulence genes

The segments of the expected size for the genes *inlA*, *inlB*, *inlC* and *inlJ*, involved in the bacterium adhesion and host cells invasion; *hly* and *plcA* involved in the escaping from the vacuole; and the regulator *prfA* were amplified in all samples (data not shown). Comparisons of the amplified segment sequences with published sequences revealed 98 to 100% identity (data not shown).

A 432 bp segment was detected, instead of the expected 537 bp segment, indicating a 105 bp deletion. This amplicon was present in all samples for the *actA* gene, which is involved in the cell-to-cell spreading ability (Figure 1).

PCR-ribotyping

All samples generated a similar amplification pattern of the intergenic spacer region 16S-23S rDNA and therefore clustered into the same ribotype. Control serotypes 1/2a and 1/2b displayed a similar amplification pattern, clustering into the same ribotype (named R1) and serotype 4b generated a different amplification pattern, therefore a separate ribotype (named R2). The six blood culture samples grouped into ribotype 2 (Figure 2).

Discussion

L. monocytogenes can be misidentified by gram-stain-determined morphology as *Corynebacterium spp*, often regarded as a contaminant, especially when the colonies grown from the clinical sample are scarce. *L. monocytogenes* is not always included in the automated systems and is not often an expected cause of infection, because of its low clinical frequency. Hence, its detection depends on a high level of skill among microbiology laboratory professionals. In Brazil, listeriosis is not a notifiable disease, so the number of Brazilian cases remains unknown. However, the severity of this life-threatening disease demands a rapid treatment to avoid a fatal outcome.

Most clinical *L. monocytogenes* isolates are susceptible to a wide range of antibiotics [22, 23]; however, resistance to chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin and trimethoprim has been reported [24]. The various automated identification systems widely employed in clinical microbiology laboratory, although easy and quick, are not always programmed for low-frequency organisms, such as *L. monocytogenes*. The need for accurate antimicrobial susceptibility determination of the microorganisms from clinical material is crucial to avoid ineffective drugs use, which can slow the treatment process and aggravate the patient's clinical condition, possibly leading to a fatal outcome. In this study, antimicrobial susceptibility tests were carried out through disk diffusion on agar, and the cultures were determined to be resistant to cefoxitin alone.

The six cultures were classified as serotype 4b, the most frequent causative agent of human listeriosis, and clustered into the same ribotype, indicating a single strain. All the cultures harbored the virulence genes involved in the different stages of the infection. Surprisingly, the gene *actA*, involved in the actin-dependent intracellular motility, displayed a 105 bp deletion. Others have reported a decrease in mice lethality and in cell-to-cell spreading ability in plaque formation essays of 4b serotype strains carrying a similar deletion [25]. A substitution of alanine for proline at 267 position in the *actA* gene, or absence of other genes, such as *inlC* and *inlJ*, may be responsible for the reduced intracellular propagation capacity [26]. However, the ability to spread to other cells and mice lethality were not significantly reduced by the same 105 bp deletion in the *actA* gene in serotype 1/2b [27]. In our study, in spite of the 105 bp deletion in the *actA* gene, the strain remained pathogenic and capable of invading the blood stream. It is possible other virulence-related genes are involved, or the *actA* gene is not needed for infection in highly susceptible individuals.

L. monocytogenes endocarditis is rather infrequent, with barely over 70 cases published in the world [28]. Individuals with a history of rheumatic heart disease,

hypertrophic cardiomyopathy, mitral valve prolapse or ischemic cardiomyopathy are particularly susceptible [4, 28]. The average age of *L. monocytogenes* endocarditis patients increased from 47.1 years during the period from 1955 to 1984 to 65.5 years from 1985 to 2000 [4]. The patient from our study was the youngest (28 years) among those patients in the available published literature.

In conclusion, although uncommon, *L. monocytogenes* infection should always be considered in the differential endocarditis diagnosis due to its high pathogenicity and broad environmental distribution, which may increase the frequency of contamination by this organism.

References

- [1] J. A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, J. Kreft. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical microbiology reviews, vol. 14, no. 3, pp. 584-640, 2001.
- [2] F. Allenberger, M. Wagner. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clinical microbiology and infection, vol. 16, p. 16–23, 2009.
- [3] V. Dias, S. Cabral, D. Anjo, M. Vieira, N. Antunes, G. Carvalheiras, C. Gomes, A. Meireles, T. Mendonça, S. Torres. Successful management of *Listeria monocytogenes* pericarditis: case report and review of the literature. Acta cardiologica, vol. 66, no. 4, pp. 537-538, 2011.
- [4] M. L. Fernández Guerrero, P. Rivas, R. Rábago, A. Núñez, M. de Górgolas, J. Martinell. Prosthetic valve endocarditis due to *Listeria monocytogenes*. Report of two cases and reviews. International journal of infectious diseases, vol. 8, no. 2, pp. 97-102, 2004.
- [5] M. Delvallée, N. Ettahar, C. Loïez, C. Decoene, R. Courcol, F. Wallet. An unusual case of fatal pericarditis due to *Listeria monocytogenes*. Japanese journal of infectious disease, vol. 65, no. 4, pp. 312-314, 2012.
- [6] C. Summa, S.A. Walker. Endocarditis due to *Listeria monocytogenes* in an academic teaching hospital: case report. The Canadian journal of hospital pharmacy, vol. 63, no. 4, pp. 312-314, 2010.
- [7] M. Pocar, D. Passolunghi, A. Moneta, F. Donatelli. Fulminant prosthetic valve endocarditis caused by *Listeria monocytogenes*. European Journal of Cardio-thoracic Surgery, vol. 36, no. 6, pp. 1077, 2009.
- [8] D. Pierce, B. C. Calkins, K. Thornton. Infectious endocarditis: diagnosis and treatment. American family physician, vol. 85, no. 10, pp. 981-986, 2012.

- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement (M100-S22). 2012. Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [10] F.M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. Sideman, J. Smith, K. Struhl. Current Protocol in molecular biology. New York: Wiley, 1987.
- [11] J. A. Hudson, R.J. Lake, M. G. Savill, P. Scholes, R. E. McCormick. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. Journal of applied microbiology, vol. 90, no. 4, pp. 614-621, 2001.
- [12] Y. Chen, S. J. Knabel. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. Applied and environmental microbiology, vol. 73, no. 19, pp. 6299-6304, 2007.
- [13] M. K. Borucki, D. R. Call. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. Journal of clinical microbiology, vol. 41, no. 12, p. 5537-5540, 2003.
- [14] M. Doumith, C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet, P. Martin. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. Journal of clinical microbiology, vol. 42, no. 8, pp. 3819-3822, 2004.
- [15] A. Ingiani, M. Floris, P. Palomba, M. A. Madeddu, M. Quartuccio, R. Pompei. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe. Molecular and cellular probes, vol. 15, no. 5, pp. 275-280, 2001.
- [16] J. Johnson, K. Jinneman, G. Stelma, B. G. Smith, D. Lye, J. Messer, J. Ulaszek, L. Evsen, S. Gendel, R. W. Bennett, B. Swaminathan, J. Pruckler, A. Steigerwalt, S. Kathariou, S. Yildirim, D. Volokhov, A. Rasooly, V. Chizhikov, M. Wiedmann, E. Fortes E, R. E. Duvall, A. D. Hitchins. Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes Applied and environmental microbiology, vol. 70, no. 7, pp. 4256-4266, 2004.
- [17] D. Liu, M. L. Lawrence, F. W. Austin, A. J. Ainsworth. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. Journal of microbiological methods, vol. 71, no. 2, pp. 133-140, 2007.
- [18] S. Kaur S, S. V. Malik, V. M. Vaidya, S. B. Barbuddhe. *Listeria monocytogenes* in spontaneous abortions in humans and its detection by multiplex PCR. Journal of applied microbiology, vol. 103, no. 5, pp. 1889-96, 2007.
- [19] M. Wiedmann, J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough, C. A. Batt. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infection and immunity, vol. 65, no. 7, pp. 2707-2716, 1997.

- [20] K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, vol. 24, no. 8, pp. 1596-1599, 2007.
- [21] J. Chun, A. Huq, R. R. Colwell. Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and environmental microbiology*, vol. 65, no. 5, pp. 2202-2208, 1999.
- [22] E. Charpentier, P. Courvalin. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, vol. 43, no. 9, pp. 2103-2108, 1999.
- [23] J. Poroś-Głuchowska, Z. Markiewicz. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. *Acta microbiologica Polonica*, vol. 52, no. 2, pp. 113-129, 2003.
- [24] P. Aureli, A. M. Ferrini, V. Mannoni, s. Hodzic, c. Wedell-Weergaard, B. Oliva. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International journal of food microbiology*, vol. 83, no. 3, pp. 325-330, 2003.
- [25] T. Chakraborty, F. Ebel, J. Wehland, J. Dufrenne, S. Notermans. Naturally occurring virulence-attenuated isolates of *Listeria monocytogenes* capable of inducing long term protection against infection by virulent strains of homologous and heterologous serotypes. *FEMS immunology and medical microbiology*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9, 1994.
- [26] M. Geese, J. J. Loureiro, J. E. Bear, J. Wehland, F. B. Gertler, A. S. Sechi. Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of *Listeria* requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Molecular biology of the cell*, vol. 13, no. 7, pp. 2383-2396, 2002.
- [27] J. Chen, X. Luo, L. Jiang, P. Jin, W. Wei, D. Liu, W. Fang. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food microbiology*, vol. 26, no. 1, pp. 103-111, 2009.
- [28] J. Antolín, A. Gutierrez, R. Segoviano, R. López, R. Ciguenza. Endocarditis due to *Listeria*: Description of two cases and review of the literature. *European Journal of Internal Medicine*, vol. 19, pp. 295-296, 2008.

Figure 1: Multiple alignments of partial sequences showing the 105 bp deletion of actA gene in samples from blood cultures compared with reference strains.

```

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

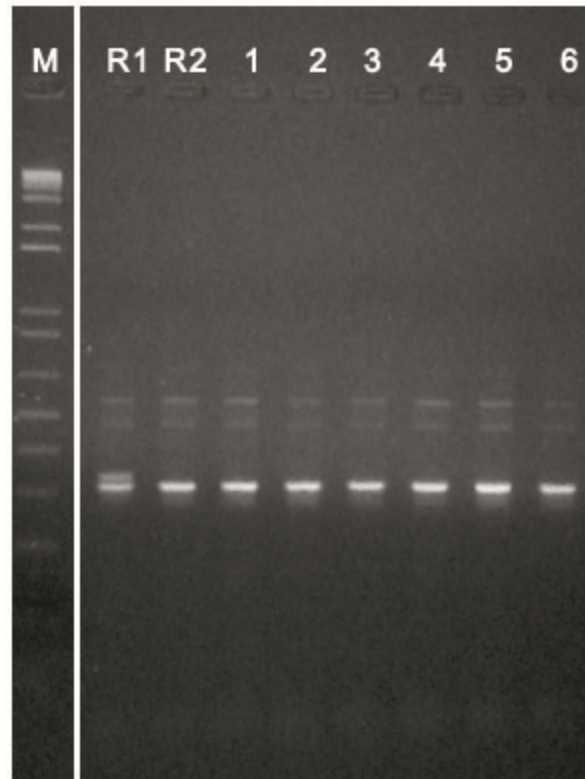
589      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 404
590      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 403
591      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 405
782      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 400
780      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 401
781      AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAG----- 401
CDC F4561 AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAGGCGGTGGAATTCGA 415
ATCC 19155 AAGGTGCTGTTTCCCGCATAATTCTAGTTCATCTTCTGTTGGAGGCGGTGGAATTCGA 415
*****

589      -----
590      -----
591      -----
782      -----
780      -----
781      -----
CDC F4561 ATGAGCTCGGTTCCGATGTAGCAGGAGCATTAAAACCAAGAAGCATTGGCGTCTCTGGCA 475
ATCC 19155 ATGAGCTCGGTTCCGATGTAGCAGGAGCATTAAAACCAAGAAGCATTGGCGTCTCTGGCA 475

589      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 434
590      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 433
591      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 435
782      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 430
780      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 431
781      -----GTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 431
CDC F4561 AAGCAAGTCTTAACCTTTCATCCGTAGGTGGTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 535
ATCC 19155 AAGCAAGTCTTAACCTTTCATCCGTAGGTGGTGGTGGAATTCGAATGAGCTCGGTTCCG 535
*****

```

Figure 2: PCR ribotyping profile. Lines: M: 100bp Molecular marker; R1: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, serotype 4b; R2: *Listeria monocytogenes* CDC F4976, serotype 1/2b; 1-6 samples of the study.



Artigo 4

Desenvolvimento e avaliação de um teste baseado na amplificação isotérmica mediada por *loop* para detecção dos principais sorotipos patogênicos de *Listeria monocytogenes*

Development and evaluation of a loop mediated isothermal amplification-based procedure for detection of the major *Listeria monocytogenes* pathogenic serotypes

Ana Paula Rocha da Costa^{1,2}, Mariana de Lira Nunes², Alzira Maria Paiva de Almeida², Nilma Cintra Leal²

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

²Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ-PE, Avenida Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50.670-901 Recife, PE, Brazil

Manuscrito a ser submetido a “Journal of Microbiological Methods”

Resumo

Neste trabalho foi padronizado um procedimento para identificação de *Listeria monocytogenes* e dos três principais sorotipos patogênicos da espécie (1/2a, 1/2b, 4b) com base nas sequências lmo2234, lmo0737, gltB e ORF2110 por *loop mediated isothermal amplification* (LAMP). A técnica se mostrou sensível, capaz de detectar 100pg de DNA extraído de culturas de *L. monocytogenes* ou 10⁴ UFC, e espécie - específica, capaz de diferenciar *L. monocytogenes* de espécies intimamente relacionadas geneticamente. Outros sorotipos (3a, 3b, 4e e 4d) foram amplificados, sem detrimento para a técnica, porque raramente são encontrados em isolados clínicos e de alimentos. A técnica desenvolvida se apresenta como uma alternativa fácil e rápida para diagnóstico e tipagem de *L. monocytogenes* especialmente para os programas de vigilância e investigação epidemiológica.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. LAMP. Sorotipos. Diagnóstico. Virulência.

1. Introdução

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo, transmitido por alimentos, causador da listeriose, doença de gravidade variada que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, grávidas, recém-nascidos e idosos (Vázquez-Bole et al., 2001). Cepas de *L. monocytogenes* são tradicionalmente identificadas através de provas bioquímicas e sorotipagem por aglutinação ou reação imunoenzimática (ELISA) (Palumbo et al., 2003). Através da aglutinação foram identificados 12 sorotipos com base nos antígenos O (somático) e H (flagelar), no entanto, pelo menos 95% dos isolados de alimentos e pacientes pertencem a apenas três sorotipos que são considerados os mais patogênicos (1/2a, 1/2b e 4b) (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

Através de sequências genéticas identificadas pelas técnicas de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e *multilocus enzima eletroforese* (MLEE) os sorotipos foram agrupados em três linhagens genéticas: a linhagem I que inclui os sorotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e e 7, a linhagem II, os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e a linhagem III, os sorotipos 4a e 4c (Brosch et al., 1994; Graves et al., 1994; Wiedmann et al. (1997). Isolados da linhagem I incluem os principais clones epidêmicos de *L. monocytogenes* responsáveis pelo maior número de casos de listeriose humana, isolados da linhagem II são provenientes principalmente de alimentos e do ambiente e isolados da linhagem III são encontrados principalmente em animais (Cossart, 2011).

A identificação de marcadores genéticos especificamente associados aos grupos filogenéticos possibilitou o desenvolvimento de procedimentos de identificação e tipagem molecular baseados em PCR (PCR-Multiplex) mais rápidos e simples que as técnicas tradicionais (Borucki e Call, 2003; Chen e Knabel, 2007; Doumith et al., 2004a).

A amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP - *loop-mediated isothermal amplification*) é um método de amplificação de ácidos nucleicos que se baseia na síntese não cíclica de DNA realizada pela enzima Bst polimerase e emprega um conjunto de no mínimo quatro *primers* específicos, dois internos (FIP e BIP) e dois externos (F3 e B3); e opcionalmente dois *loop primers* o que aumenta a sensibilidade e a rapidez da reação (Nagamine et al., 2002). Em comparação à PCR convencional, LAMP apresenta como vantagens dispensar o uso de termocicladores porque a amplificação pode ser realizada em um bloco de aquecimento ou banho-maria (Notomi et al., 2000) e o uso de eletroforese, uma vez que a amplificação pode ser detectada pela visualização da turvação do produto a olho nu ou sob luz ultravioleta (UV) mediante adição de reagentes fluorescentes, como SYBR Green

(Mori et al., 2001, Parida et al., 2008), além da rapidez do processo que pode ser realizado em apenas uma hora sob condições isotérmicas.

Devido à importância da identificação e caracterização de cepas de *L. monocytogenes* em investigações epidemiológicas e controle de qualidade na produção de alimentos desenvolvemos um novo procedimento para a identificação de *L. monocytogenes* e dos três principais sorotipos patogênicos da espécie por LAMP.

De acordo com os resultados a técnica LAMP constitui uma alternativa fácil e rápida para diagnóstico e tipagem sorológica de *L. monocytogenes* especialmente para os programas de vigilância e investigação epidemiológica.

2. Material e métodos

2.1 Bactérias

O trabalho envolveu 18 cepas de referência do gênero *Listeria* (*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. monocytogenes* sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e, 3a, 3b e 3c) (Tabela 1). As cepas foram obtidas por cortesia do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) e mantidas em triptose agar (Biobras) a 4°C no Departamento de Microbiologia do CPqAM-FIOCRUZ/PE. As cepas foram reativadas pela inoculação em meio BHI (Brain Heart Infusion, Biobras), incubadas a 37°C por 24h e plaqueadas em agar sangue de carneiro 5% para confirmar a pureza das culturas.

2.2 Extração de DNA

O DNA das culturas foi extraído e quantificado segundo um protocolo desenvolvido com base em Ausubel et al., (1987). Em resumo: 1 ml de crescimento bacteriano em BHI foi centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm. O sedimento foi lavado com 500 µL de TE 10:1 e a cada tubo foi adicionado 10 µL de lisozima 1% + 10 µL de proteinase K 0,5%, incubados a 60°C por 20 minutos e adicionados 100 µL de STE (SDS 2,5%, EDTA 0,25M, Tris pH 8,0 10mM), incubado a 60°C por 15 minutos, mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos e em banho de gelo por 5 minutos; adicionado 130 µL de acetato de sódio 7,5M, incubado no banho de gelo por 15 minutos e centrifugado por 3 minutos a 14.000 rpm. 700 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 420 µL de isopropanol foi adicionado a

cada amostra, incubado a -80°C por 30 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA foi seco a vácuo e ressuspensionado em 10 μL de RNase 0,02%. O DNA foi quantificado pela comparação com a quantidade de DNA conhecida do HindIII λ (Sigma).

2.3 Desenho dos *primers* LAMP

Um conjunto de quatro *primers*, dois externos (F3, B3) e dois internos (FIP, BIP), foi usado para cada alvo: lmo2234 específico para *L. monocytogenes*, lmo0737 para o sorotipo 1/2a (Chen e Knabel 2007), *gltB* para o sorotipo 1/2b (Borucki e Call, 2003) e ORF2110 para o sorotipo 4b (Doumith et al., 2004a) (Tabela 2). Os *primers* foram desenhados usando o Primer Explorer software V4 (<http://primerexplorer.jp/>) considerando o conteúdo de GC (guanina-citosina), T_m (temperatura de dissociação), estabilidade do final da sequência dos *primers*, formação de estrutura secundária e distância entre os *primers*.

2.4 Padronização da técnica e análise dos produtos obtidos nas reações por LAMP

As reações foram realizadas seguindo um protocolo desenvolvido com base em Tomita et al., (2008). A mistura de reação em volume final de 25 μL consiste de 50 pmol de cada *primer* interno, 5 pmol de cada *primer* externo, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 mM MgSO_4 , 10 mM KCl, 1.4 mM dNTPs, 0.8 M betaine, 0.1% Tween 20, 8 unidades de Bst DNA polimerase (New Engle Biolabs) e 20ng de DNA molde de três cepas de *L. monocytogenes*. Em cada reação de amplificação, foi utilizado um controle negativo contendo todos os componentes da reação exceto DNA molde. As reações foram realizadas utilizando um termociclador (Biometra) e em banho maria, em temperatura isotérmica constante (63°C) e tempo de incubação variado (15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos) para determinar o tempo mínimo de incubação para visibilidade dos produtos amplificados. Para avaliar o melhor método de detecção os produtos foram analisados por eletroforese em geis de agarose ou pela adição dos marcadores fluorescentes Sybr Safe e Sybr Green.

2.4 Determinação da sensibilidade da técnica LAMP

A sensibilidade da técnica LAMP foi determinada por reações usando quantidade conhecida de DNA, quantificado por espectrofotometria (NanoDrop -Thermo Scientific) e

diluições seriadas do DNA de cultura das cepas CDC F4561 (1/2a), CDC F4976 (1/2b) e ATCC 19115 (4b). Para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) detectáveis pela técnica, culturas das três cepas foram diluídas seriadamente e alíquotas de 100µL de cada diluição foram plaqueadas em duplicata em agar BHI e as UFC foram contadas após incubação por 24 h a 37°C.

2.5 Especificidade da técnica LAMP

Para determinar a especificidade da técnica foram realizados ensaios em triplicata utilizando como molde DNA extraído de quatro cepas do gênero *Listeria* e de 14 cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos (tabela 1).

3. Resultados

3.1 Padronização das condições de reação e visualização dos produtos LAMP

Através dos ensaios utilizando o DNA de três cepas de *L. monocytogenes* (CDC F4561 - 1/2a, CDC F4976 - 1/2b e ATCC 19115 - 4b) e quatro conjuntos de *primers* (lmo2234, lmo0737, *gltB* e ORF2110) a 63°C concluiu-se que 60 minutos de incubação são suficientes para amplificação por LAMP. O mesmo resultado foi obtido nos ensaios realizados em termociclador e em banho-maria.

Nessas condições os produtos obtidos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1% (figura 1) e mesmo a olho nu pela mudança de coloração do laranja para o verde pela adição de SYBR® Green (Promega) (Figura 2a) ou através de iluminação UV pela adição de SYBR® Safe (Invitrogen™) (Figura 2b).

3.2 Sensibilidade da técnica LAMP

Foram realizados ensaios utilizando como molde oito diluições contendo de 200ng a 1pg de DNA purificado das cepas CDC F4561 - 1/2a, CDC F4976 - 1/2b e ATCC 19115 - 4b. O limite de detecção por LAMP de DNA purificado foi de 100pg de DNA das cepas analisadas.

Foram realizados ensaios utilizando como molde seis diluições de suspensões bacterianas contendo de 10⁶ a 10 UFC das cepas CDC F4561 - 1/2a, CDC F4976 - 1/2b e

ATCC 19115 - 4b. O limite de detecção por LAMP a partir de suspensões bacterianas foi de 10^4 UFC/reação.

3.3 Especificidade do LAMP

Nos ensaios com o *primer* lmo2234 e o DNA das culturas de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* houve amplificação apenas de *L. monocytogenes*, todos os sorotipos foram amplificados (tabela 1). Não houve amplificação com as demais espécies do gênero *Listeria* avaliadas.

Com o *primer* dirigido para o sorotipo 1/2a houve amplificação dos sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c de *L. monocytogenes*; os outros sorotipos e espécies do gênero *Listeria* não foram amplificados.

Com o *primer* dirigido para o sorotipo 1/2b houve amplificação dos sorotipos 1/2b e 3b de *L. monocytogenes*; os outros sorotipos e espécies do gênero *Listeria* não foram amplificados.

Com o *primer* dirigido para o sorotipo 4b houve amplificação dos sorotipos 4b, 4d e 4e de *L. monocytogenes*; os outros sorotipos e espécies do gênero *Listeria* não foram amplificados.

4. Discussão

Embora rara, a listeriose constitui um grave problema de saúde pública, devido à elevada mortalidade, em torno de 20 a 30% dos casos (Watson, 2009). A ingestão de alimentos contaminados é considerada a fonte primária de infecção, tanto em casos esporádicos, como em epidemias de listeriose (Allerberger e Wagner, 2009). A infecção por *L. monocytogenes* produz sintomas não específicos, como meningite e septicemia. Assim, a disponibilidade de testes diagnósticos rápidos, sensíveis e específicos para identificação de *L. monocytogenes* é útil para a seleção de regimes de tratamento adequados (Liu, 2006). Além disso, como *L. monocytogenes* possui uma diversidade de linhagens de patogenicidade variada, a capacidade de identificar cepas avirulentas contaminantes de alimentos ou patogênicas envolvidas em surtos de listeriose e rapidamente determinar seu potencial patogênico é fundamental para o controle e prevenção da doença (Liu, 2006).

LAMP é um método de amplificação de DNA com alta eficiência sob condições isotérmicas (Notomi et al., 2000). A elevada especificidade da técnica é devida ao reconhecimento da sequência alvo por seis sequências independentes no estágio inicial da reação e quatro sequências durante os últimos estágios da reação, utilizando um conjunto de quatro *primers* por sequência. Além disso, o método é relativamente simples e de fácil execução, pois requer apenas um banho-maria ou placa aquecedora para a sua realização (Parida et al., 2008).

Dentre os 12 sorotipos de *L. monocytogenes* identificados apenas três são mais frequentemente isolados de casos clínicos e alimentos: o sorotipo 4b é o principal responsável por casos clínicos e surtos de listeriose (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007), os sorotipos 1/2a e 1/2b estão associados a infecções esporádicas (Wiedmann et al., 1996) e os sorotipos 1/2a, 1/2b além do 1/2c predominam em isolados de alimentos (Vázquez-Bole et al., 2001).

Diante disso, após a identificação do microrganismo em amostras clínicas ou de alimentos, é necessário proceder à classificação sorológica do isolado. No entanto, na rotina dos laboratórios clínicos a sorotipagem apresenta dificuldades pelo custo, carência de reagentes padronizados e da expertise técnica necessária para a realização dos testes. Kits para testes imunoenzimáticos (Palumbo et al., 2003) disponíveis comercialmente e protocolos baseados na PCR, PCR-multiplex, para a identificação dos sorotipos patogênicos (Borucki e Call, 2003; Chen e Knabel, 2007; Doumith et al., 2004a) superam algumas das dificuldades, mas esses procedimentos também são onerosos e necessitam de equipamentos sofisticados para a realização e leitura dos resultados inviabilizando a implantação em laboratórios de campo.

A técnica LAMP é de mais fácil operacionalização porque requer apenas um banho-maria além dos insumos da reação e tem a vantagem do tempo de reação reduzido. A preparação de um mix de LAMP (ou de PCR) é bem mais simples do que a execução de um teste sorológico e uma vez tendo o kit montado, o operador só precisará adicionar o DNA ou cultura.

A técnica desenvolvida para a identificação de *L. monocytogenes* tendo como alvo o gene *lmo2234* se mostrou sensível, capaz de detectar 100pg de DNA ou 10^4 UFC, e espécie - específica, sendo capaz de diferenciar *L. monocytogenes* de espécies intimamente relacionadas geneticamente, como *Listeria innocua* (Graves et al., 2010).

No entanto, os ensaios para identificação dos sorotipos se revelaram menos específicos: com o sorotipo 1/2a houve também amplificação dos sorotipos 1/2c, 3a e 3c; o sorotipo 1/2b também amplificou o sorotipo 3b; e o sorotipo 4b também amplificou os sorotipos 4b e 4e. Esses resultados devem-se a existência de antígenos H e O (Liu et al., 2006; Schonberg et al., 1996), além de sequências genéticas em comum compartilhados pelos sorotipos (Cossart, 2011). Dessa forma as sequências genéticas selecionadas para emprego na técnica LAMP são compartilhadas entre os sorotipos intimamente relacionados: *lmo0737* entre os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a e 3c (Chen e Knabel, 2007), *gltB*, entre 1/2b e 3b (Borucki e Call, 2003) e *ORF2110* entre 4b, 4d e 4e (Doumith et al., 2004a).

O fato de não diferenciar os sorotipos 1/2a de 1/2c, 3a e 3c; 1/2b de 3b e 4b de 4b e 4e não invalida a técnica LAMP por nós padronizada visto que os sorotipos 3a, 3b, 4e e 4d são raramente isolados de alimentos e pacientes. Segundo dados coletados pelo Centro de Referência Nacional na França (Doumith et al., 2004a) mais de 98% de 5.000 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e pacientes entre 2001 e 2004 são dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, e 4b, que são discriminados em três grupos pela técnica LAMP padronizada.

Pode-se concluir que a técnica LAMP padronizada é uma alternativa fácil e rápida para diagnóstico e tipagem sorológica de *L. monocytogenes* especialmente para os programas de vigilância e investigação epidemiológica. Na prática o *loop primer* reduziria o tempo de incubação em pelo menos 25% e possivelmente aumentaria a sensibilidade da reação, mas usualmente este *primer* só é empregado após a padronização da reação com os *primers* internos e externos. Trabalhos estão em andamento para otimização da técnica com a introdução do *loop primer*.

5. Referências

- Allerberger F. e Wagner M., 2009. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. Clin. microbiol. infect., 16, 16–23.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D. , Sideman, J., Smith, J. Struhl, K., 1987. Current Protocol in molecular biology. New York: Wiley.
- Borucki, M. K. e Call, D. R., 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. J. clin. microbiol., 41, 5537–5540.

Brosch, R., Chen, J., Luchansky, J.B., 1994. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: Identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* e their correlation with serovar. Appl. environ. microbiol., 60, 2584–2592.

Chen, Y. e Knabel, S. J., 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, e major serotypes e epidemic clones of *L. monocytogenes*. Appl. environ. microbiol., 73, 6299–6304.

Cossart, P., 2011. Illuminating the lescape of host–pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 108, 19484–19491.

Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. e Martin, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. J. clin. microbiol., p. 3819–3822, vol. 42, no. 8, 2004.

Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. e Saud, B. D. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. Int. j. syst. evol. microbiol., 60, 1280–1288.

Graves, L. M., Swaminathan, B., Reeves, M. W., Hunter, S. B., Weaver, R. E., Plikaytis, B. D. e Schuchat, A., 1994. Comparison of ribotyping e multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. J Clin Microbiol, 32, 2936–2943.

Liu, D., 2006. Identification, subtyping e virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. medical microbiol., 55, 645–659.

Liu, D., Lawrence, M. L., Gorski, L., Merell, R. E., Ainsworth, A. J. e Austin, F W., 2006. *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Strains Belonging to Lineages I e III Possess Distinct Molecular Features. J. clin. microbiol., 44, 214–217.

Mori, Y., Nagamine, K. , Tomita, N., Notomi, T., 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. Biochem. biophys. res. commun., 289, 150-154.

Nagamine, K., Hase, T. Notomi, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes.*, London, vol. 16, no. 3, pp. 223-229, 2002

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. e Hase, T., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids res.*, 28, E63.

Palumbo, J. D., Borucki, M. K., Merell, R. E. e Gorski, L., 2003. Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay e identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 564–571.

Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L. e Morita, K., 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases, *Rev. med. virol.*, 18, 407–421.

Schönberg, A., Bannermanb, E. , Courtieuc, A.L., Kissd, R., McLauchlin, J., Shah, S., Wilhelms, D. , 1996. Serotyping of 80 strains from the **WHO** multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. j. food microbiol.*, 32, 279-287.

Swaminathan, B. e Gerner-Smidt, P. , 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbres infect.*, 9, 1236-1243.

Tomita, N., Mori, Y., Kea, H., Notomi, T., 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences e simple visual detection of products. *Nat Protoc.*, 3, 877-882.

Vázquez-Bole, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehle, J., e Kreft, J., 2001. *Listeria* pathogenesis e molecular virulence determinants. *Clin. microbiol. rev.*, 14, 584–640.

Watson R., 2009. Deaths from listeriosis remain a cause for concern in Europe. *BMJ.*, 338,b319.

Wiedmann, M., Bruce, J. L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E.M., McDowell, C.I., McDonough, P.L. e Batt, C.A., 1996. Ribotype diversity of *Listeria monocytogenes* strains associated with outbreaks of listeriosis in Ruminants. *J. clin. microbiol.*, 34, 1086-1090.

Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L. e Batt, C. A., 1997. Ribotypes e virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. immun.*, 65, 2707–2716.

Tabela 1 - Cepas de *Listeria* utilizadas

Nº CPqAM/FIOCRUZ-PE	Cepas	Espécie/sorotipo
502	CIP 12612	<i>Listeria innocua</i>
503	CDC F4561	<i>Listeria monocytogenes</i> ½ a
504	CDC F4976	<i>Listeria monocytogenes</i> ½ b
505	CDC F6254	<i>Listeria monocytogenes</i> ½ c
506	ATCC 19112	<i>Listeria monocytogenes</i> ½ c
507	CDC F45555	<i>Listeria monocytogenes</i> 4 b
508	ATCC 19115	<i>Listeria monocytogenes</i> 4 b
509	ATCC19119	<i>Listeria ivanovii</i>
510	CIP 8493	<i>Listeria seeligeri</i>
511	CIP 11633	<i>Listeria welshimeri</i>
598	ATCC 19144	<i>L. monocytogenes</i> 4a
599	CDC F 1067	<i>L. monocytogenes</i> 4ab
600	ATCC 19116	<i>L. monocytogenes</i> 4c
601	ATCC 19117	<i>L. monocytogenes</i> 4d
602	ATCC 19118	<i>L. monocytogenes</i> 4e
603	CDC F 4540	<i>L. monocytogenes</i> 3a
604	CDC F 4538	<i>L. monocytogenes</i> 3b
605	CDC F 6238	<i>L. monocytogenes</i> 3c

Tabela 2 - *Primers* usados: alvos, denominação, sequências

Alvos	Primer	Sequências
<i>lmo2234</i> (<i>L.monocytogenes</i>)	F3	5' GGCAATCTAAAAAATGCCCCA 3'
	B3	5' GTACTCCACTTCTGTTACTTTCATG 3'
	FIP	5' ACCATTTTCCGCAGCGACTTTCA- TTAGCTCTTACACACTAGGAACG 3'
	BIP	5' GACGGAATTGGCTTGCGTGC- ATCCGCAACATGTCTTCATCG 3'
<i>lmo0737</i> (Sorotipo 1/2a)	F3	5' ACTCTTGAATCATACGCACACT 3'
	B3	5' GAAGTTGCTAGGTAACGATGTCTT 3'
	FIP	5' AGCAATTGATTGATGCAGGCGC- ACCGTGTCTTGATCCTGGAG 3'
	BIP	5' GCATCTTGTTTAGCAAGTGGATCGC- GCTGGAAAATGGGAAGATGGTAT 3'
<i>gltB</i> (Sorotipo 1/2b)	F3	5' TGGCACTATAATAAGCTTTGTCC 3'
	B3	5' CATCGCAAAGATTTTATGTTAACGT 3'
	FIP	5' CCAAGTATTAGGAGTTATAAGGGGA- GTCTGATCAATACTCCCATCCAT 3'
	BIP	5' AGACCAATAAAGCCACTTTTAACAA- AATAAAAACAGAGGTGAACATCA 3'
<i>ORF2110</i> (Sorotipo 4b)	F3	5' TGTTCAGTTTTTGTCCCAAT 3'
	B3	5'TGGACAATTTGGTTGGTGAAG 3'
	FIP	5' GCTCCTTTTGGAACAGCAAAAGCAA- CACCATAATCTTCTGTAGAAGGTTC 3'
	BIP	5' CAGTCACTTTTTTTGCCCATCCACC- CTGTACTTACAGCCGCTCAT 3'

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos de amplificação por LAMP. M – Ladder 100pb (invitrogen). Linhas 1 - LAMP *L. monocytogenes* (*lmo2234*); 2 – LAMP *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a (*lmo0737*); linha 3 – LAMP *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b (*gltB*); Linhas 4 – LAMP *L. monocytogenes* sorotipo 4b (*ORF2110*).

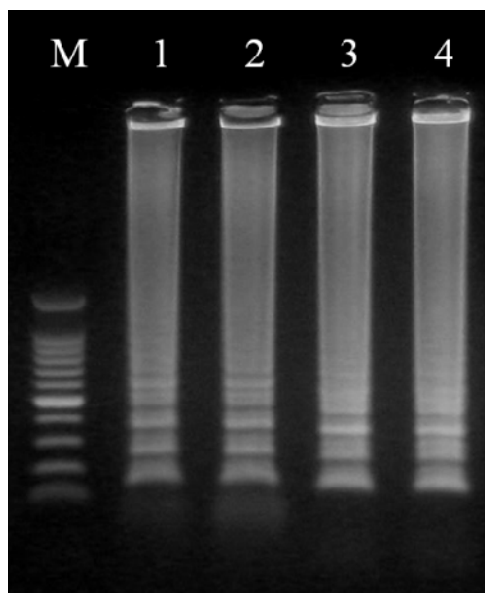
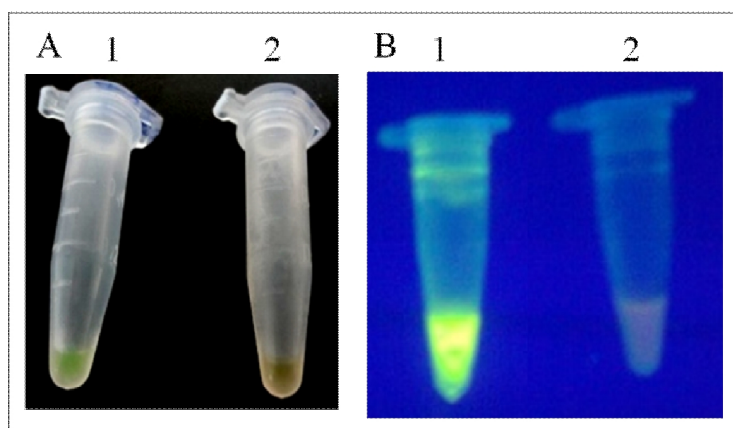


Figura 2: Produtos amplificados por LAMP. A – Visualização a olho nu. B – Visualizaçõesob iluminação UV. Tubo 1 – Reação positiva. Tubo 2 - Reação negativa.



Anexo A - Parecer do comitê de ética animal.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-presidência de Pesquisa e
Laboratórios de ReferênciaComissão de Ética
no Uso de Animais**LICENÇA****LW-29/10**

Certificamos que o protocolo (P-42/10-2), intitulado "Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil", sob a responsabilidade de NILMA CINTRA LEAL, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 23/08/2013 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 180 Machos de Swiss Webster, Idade: 35 Dia(s), Peso: 40,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 23 de agosto de 2010

**Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA**

Anexo B: Normas das revistas

Artigo 1 - Current Microbiology

Double-blind peer review

This journal follows a double-blind reviewing procedure. Authors are therefore requested to submit two documents at the time of their submission:

A title page only, which includes:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

- Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

- Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

A blinded manuscript without any author names and affiliations in the text or on the title page. Self-identifying citations and references in the article text should either be avoided or left blank.

- Manuscript Submission
 - Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.
- Permissions
 - Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

- Online Submission

- Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

1. The manuscript should not be longer than 12 pages, double spaced, including Figures and Tables .
2. The references should be listed alphabetically, then numbered.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

• Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Artigo 2 - Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The manuscript should be prepared using standard word processing software and should be printed (font size 12) double-spaced throughout the text, figure captions, and references, with margins of at least 3 cm. The figures should come in the extension tiff, with a minimum resolution of 300 dpi. Tables and legends to figures must be submitted all together in a single file. Figures, must be uploaded separately as supplementary file.

The manuscript should be arranged in the following order:

Running title: with up to 40 characters (letters and spaces)

Title: with up to 250 characters

Author's names: without titles or graduations

Institutional affiliations: full address of the corresponding author only

Summary: up to 200 words (100 words in case of short communications). It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Key words: 3-6 items must be provided. Terms from the Medical Subject Headings (Mesh) list of Index Medicus should be used.

Sponsorships: indicating the sources of financial support and change of address.

Introduction: should set the purpose of the study, give a brief summary (not a review) of previous relevant works, and state what new advance has been made in the investigation. It should not include data or conclusions from the work being reported.

Materials and Methods: should briefly give clear and sufficient information to permit the study to be repeated by others. Standard techniques need only be referenced.

Ethics: when reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983. When reporting experiments on animals, indicate whether the institution's or a national research council's guide for, or any national law on the care and use of laboratory animals was followed.

Results: should be a concise account of the new information discovered, with the least personal judgement. Do not repeat in text all the data in the tables and illustrations.

Discussion: should be limited to the significance of the new information and relate the new findings to existing knowledge. Only unavoidable citations should be included.

Acknowledgements: should be short and concise, and restricted to those absolutely necessary.

REFERENCES

Must be accurate. Only citations that appear in the text should be referenced. Unpublished papers, unless accepted for publication, should not be cited. Work accepted for publication should be referred to as "in press" and a letter of acceptance of the journal must be provided. Unpublished data should only be cited in the text as "unpublished observations", and a letter of permission from the author must be provided. The references at the end of the paper should be arranged in alphabetic order according to the surname of the first author.

THE TITLE OF JOURNALS

Should be abbreviated according to the style used in the Index Medicus.

Consult: <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>

In the text use authors' surname and date Lutz (1910) or (Lutz 1910)

With two authors it is (Lutz & Neiva 1912) or Lutz and Neiva (1912)

When there are more than two authors, only the first is mentioned Lutz et al. (1910) or (Lutz et al. 1910).

AT THE END OF THE PAPER USE THE FOLLOWING STYLES

Journal article

Chagas C, Villela E 1922. Forma cardiaca da tripanosomiose americana. Mem Inst Oswaldo Cruz 14: 15-61.

Book and Thesis

Forattini OP 1973. Entomologia Médica. Psychodidae, Phlebotominae, Leishmaniose, Bartonelose, Vol. IV, Edgard Blucher, São Paulo, 658 pp.

Morel CM 1983. Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual, 2nd ed., Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, xxii + 580 pp.

Mello-Silva CC 2005. Controle alternativo e alterações fisiológicas em *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), hospedeiro intermediário de *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 pela ação do látex de *Euphorbia splendens* var. *hislopii* N.E.B (Euphorbiaceae), PhD Thesis, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 85 pp.

Chapter in book

Cruz OG 1911. The prophylaxis of malaria in central and southern Brasil. In R Ross, The Prevention of Malaria, John Murray, London, p. 390-398.

Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:

<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

DATABASE ON THE INTERNET

Open database

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html

Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from:

<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> Files updated weekly. Updated June 15, 2005

FIGURES AND TABLES MUST BE UNDERSTANDABLE WITHOUT REFERENCE TO THE TEXT

Figures: presented in tiff format with a minimum of 300 dpi and photographs must be sharply focused, well contrasted, and if mounted onto a plate, the figures should be numbered consecutively with Arabic numbers. Magnification must be indicated by a line or bar in the figure, and referenced, if necessary in the caption (e.g., bar = 1 mm). Plates and line figures should either fit one column (8 cm) or the full width (16.5 cm) of the page and should be shorter than the page length to allow

inclusion of the legend. Letters and numbers on figures should be of a legible size upon reduction or printing. A colour photograph illustrates the cover of each issue of the Journal and authors are invited to submit illustrations with legends from their manuscript for consideration for the cover.

Tables: should supplement, not duplicate, the text and should be numbered with Roman numerals. A short descriptive title should appear above each table, with any explanations or footnotes (identified with a, b, c, etc.) below.

Artigo 3 - The Scientific World Journal

Author Guidelines

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs.

Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, review, or thesis) and are not currently under consideration by any other journal. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All enquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review by a number of the editorial board members and are expected to meet standards of academic excellence.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is published using an Open Access publication model. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal, please visit the Article Processing Charges information page on the website.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included:

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9,10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution license, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal all possible conflicts of interest in their submitted manuscripts.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any human experiments, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work on human subjects who carry a risk of harm must include a statement that the experiment was conducted with the understanding and the consent of the human subject, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors should provide a full description of any anesthetic and surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing papers which describe a new zoological taxon name, The Scientific World Journal aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). The ICZN has proposed an interim solution for authors publishing in online Journals that allows us to comply with the code by providing a limited hardcopy print-run of the article and making it publicly obtainable. Therefore, for all papers that include the naming of a new zoological taxon, authors may request that a printed version be made available for outside parties at the same time as the publication of the online-only article (which remains freely available). This additional printed version of the article will contain the text noted below in the footer of the first page. This text will be added by our staff, and apart from this new footer, the printed version will be identical to the PDF of the online version:

Footer text: "This printed document was produced by a method that assures numerous identical and durable copies, and those copies were simultaneously obtainable for the purpose of providing a

public and permanent scientific record, in accordance with Article 8.1 of the International Code of Zoological Nomenclature. Date of publication:[Insert date of publication]. This document is otherwise identical to DOI:[Insert article DOI]”.

Artigo 4 – Journal of microbiological methods

INTRODUCTION

The journal publishes full-length articles describing original work, notes (short concise communications), and review articles on methods, including their development, applicability, and present status. Microbiologists are encouraged to submit to the editors product information and a summary of articles published elsewhere with relevance to the readers of the journal. This information is subject to editorial approval. Articles describing the use of computers with software description are welcome. Submissions of a paper to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere.

PREPARATION

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined

Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Glossary

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

Contact details must be kept up to date by the corresponding author.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

For 'Notes' Abstract should be no longer than 50 words

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

US or GB spelling 3-6 (Alphabetized)

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research.

Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Tables should be compiled on separate pages with a short descriptive title, and legend if required, and numbered consecutively.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

References should be listed by author name and year of publication in parentheses in the body of the text [i.e. (Crissman and Hadley, 1995) two authors; (Crissman et al., 1998) more than two authors] and listed alphabetically in the reference section. References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to List of Serial Title Word Abbreviations (available from the International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8),

the volume number, and page number. References to books should also include the title of the book, the editors, and publishers. See examples below.

Schüler, D., Uhl, R., Bäuerlein, E., 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. FEMS Microbiol. Lett. 132, 139--145.

Tyssen, P., 1993. Hybridization with nucleic acid probes. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, pp. 375-436.

Shockman, G.D., Höltje, J.-V., 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolase. In: Ghuysen, J.-M., Hakenbeck, R. (Eds.), Bacterial Cell Wall. Elsevier, Amsterdam, pp. 131- 166.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S.,

Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.