

UNIVERSIDADE PAULISTA
VICE-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL E
AMBIENTAL

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DE
***Listeria monocytogenes* DE AMBIENTES RURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Ambiental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

ALEX DE CAMARGO COQUE

SÃO PAULO
2021

UNIVERSIDADE PAULISTA
VICE-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA EXPERIMENTAL E
AMBIENTAL

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DE
***Listeria monocytogenes* DE AMBIENTES RURAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Ambiental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha

ALEX DE CAMARGO COQUE

SÃO PAULO
2021

Coque, Alex de Camargo.

Caracterização fenotípica e genética de *Listeria monocytogenes* de ambientes rurais / Alex de Camargo Coque.
- 2021.

53 f. : il. color.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Patogenia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha.

1. Listeriose. 2. Antibiograma. 3. PCR. 4. Sorotipos. I. Rocha, Paulo Ricardo Dell'Armeline (orientador). II. Título.

ALEX DE CAMARGO COQUE

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENÉTICA DE
Listeria monocytogenes DE AMBIENTES RURAIS**

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____
Prof. Dra. Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____
Prof. Dr. Genesio Mario da Rosa
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM

_____/____/____
Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador e amigo Prof. Dr. Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha por acreditar e me ajudar na confecção deste trabalho e a todos os conselhos e horas dedicadas ao projeto que tornaram possível a realização desta Dissertação. Ao colega Gabriel Baraldi Volpi que me auxiliou nas coletas e na realização do teste de suscetibilidade a antimicrobianos, ao aluno de Pós-Doc Dr. Thiago Mourinho Reis-Silva que me auxiliou na elaboração da estatística utilizada. Ao membro externo da banca de avaliação Prof. Dr. Genesio Mario da Rosa. Também os funcionários do laboratório do Centro de Pesquisas da UNIP e a todos os professores e colegas do programa Patologia Ambiental e Experimental.

Por fim, um agradecimento especial a Universidade Paulista – UNIP pela oportunidade e financiamento de minha pesquisa e a Capes pela bolsa de fomento PROSUP. “O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Muito obrigado a todos que tornaram este projeto possível.

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria que pode ser encontrado em diversos locais relacionados ao ambiente rural, é a principal causadora da listeriose, doença relevante no cenário moderno, causadora de prejuízos a indústria alimentícia e ao consumidor dada à gravidade do quadro clínico e sintomas comuns a outras doenças, e com acentuada subnotificação. No Brasil, até o momento, poucos estudos de biologia molecular foram realizados para avaliar a detecção dessa bactéria em propriedades rurais, que tem sido classificada como potencial reservatório de cepas patogênicas. No presente estudo, foram colhidas 30 amostras por *swabs* de locais relacionados ao ambiente rural, que foram posteriormente isoladas em meios de cultivo seletivos para o gênero *Listeria*. Em seguida, as amostras foram submetidas ao ensaio de reação em cadeia de polimerase (PCR) multiplex, para caracterização das espécies e principais sorotipos de *L. monocytogenes*. Além disso, as amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade e resistência a antimicrobianos. O isolamento microbiológico confirmou o crescimento do gênero *Listeria* spp. Os resultados do teste de disco-difusão demonstraram que 14 das 16 amostras testadas apresentaram resistência a pelo menos 1 dos medicamentos testados, com resistência a: Amoxicilina, Ampicilina, Eritromicina, Ciprofloxacina, Canamicina, Tetraciclina e Vancomicina em 14 das 16 amostras, o que é incomum ao gênero *Listeria* spp. Ainda, 8 amostras positivas nos meios seletivos pertenceram aos sorotipos 1/2a e 1/2b, estes sorotipos têm sido frequentemente associados a surtos de listeriose e podem ser encontrados em alimentos de origem animal, além de ruminantes e outros animais. Considerando a resistência aos antimicrobianos de ampla utilização observada no presente estudo, associada a detecção de sorotipos potencialmente virulentos, sugerimos a padronização da caracterização molecular da *L. monocytogenes* e adoção de novas normas sanitárias no Brasil, já que este patógeno pode representar ameaça à saúde pública.

Palavras-chave: Listeriose, antibiograma, rural, sorotipo, 1/2a, 1/2b, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a bacteria that can be found in several places related to the rural environment, it is the main cause of listeriosis, a relevant disease in the modern scenario, causing damage to the food industry and consumers due to the severity of the clinical condition and symptoms common to other diseases, and with marked underreporting. In Brazil, so far, few molecular biology studies have been carried out to assess the detection of this bacterium in rural properties, which has been classified as a potential reservoir of pathogenic strains. In the present study, 30 samples were collected by swabs from locations related to the rural environment, which were later isolated in selective culture media for the *Listeria* genus. Then, the samples were submitted to multiplex polymerase chain reaction (PCR) assay, to characterize the species and main serotypes of *L. monocytogenes*. In addition, the samples were submitted to antimicrobial susceptibility and resistance testing. The double-stage microbiological isolation confirmed the growth of the genus *Listeria* spp. The results of the disk-diffusion test showed that 14 of the 16 samples tested were resistant to at least 1 of the drugs tested, with resistance to: Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin Ciprofloxacin, Kanamycin, Tetracycline and Vancomycin in 14 of the 16 samples, which is unusual to the genus *Listeria* spp. Furthermore, 8 positive samples in selective media belonged to serotypes 1/2a and 1/2b, these serotypes have been frequently associated with outbreaks of listeriosis and can be found in foods of animal origin, in addition to ruminants and other animals. Considering the resistance to widely used antimicrobials observed in this study, associated with the detection of potentially virulent serotypes, we suggest standardizing the molecular characterization of *L. monocytogenes* and adopting new health standards in Brazil, as this pathogen can pose a threat to public health.

Keywords: Listeriosis, antibiogram, rural, serotype, 1/2a, 1/2b, *Listeria monocytogenes*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Foto de bebedouro automático da propriedade rural	21
Figura 2 – Meios de cultura seletivos caldo Demi-Fraser semeados a partir das amostras de ambiente rural	26
Figura 3 – Meios de cultivo seletivos ágar Listeria Oxford semeados a partir das amostras de ambiente rural	27
Figura 4 – Placa de Petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton para o teste de antibiograma	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes, oligonucleotídeos iniciadores (primers), sequências “forward” e “reverse” dos primers, peso molecular aferido em pares de bases (bp) e sorotipos que cada primer revela.....	22
Tabela 2 – Locais de coleta das amostras ambientais com resultados dos meios seletivos de cultivo utilizados.....	25
Tabela 3 – Resultados do teste de disco-difusão das amostras confirmadas por PCR como <i>Listeria</i> spp., apresentando padrões de resistência ou susceptibilidade.....	27
Tabela 4 – Resultados da PCR multiplex para triagem e caracterização das cepas de <i>Listeria</i> spp e <i>L. monocytogenes</i>	28
Tabela 5 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para <i>Listeria</i> spp.....	46
Tabela 6 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para <i>Listeria</i> spp.....	49
Tabela 7 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para <i>Listeria</i> spp.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeira monocytogenes</i>
prfA	Proteína Regulatória da Listeriolisina
inlA	Internalina A
U.S Code	United States Code
FDA	Food and Drug Administration
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
B.A.M.	Bacteriological Analytical Manual
PCR	Polymerase Chain Reaction
rt-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point
ISO	International Organization for Standardization
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
spp.	Species
TSA	Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR.....	13
1.3. ESTUDOS.....	15
1.4. LEGISLAÇÃO E NORMATIVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. OBJETIVO GERAL.....	19
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E COMISSÃO DE ÉTICA ANIMAL.....	20
3.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	21
3.3. ANÁLISE MOLECULAR.....	22
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO.....	25
4.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	27
4.3. ANÁLISE MOLECULAR.....	28
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO.....	30
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8. ANEXOS.....	46
8.1. ANEXO I.....	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria ubiquitária, gram positiva, anaeróbia facultativa, de crescimento rápido, não formadora de esporos, patógeno intracelular facultativo, possui formato de bastonete não capsulado, com tamanhos que variam de 0,4 - 2 µm (1). É a principal causadora da listeriose, doença infecciosa e zoonótica (2). A bactéria pode se desenvolver a partir de uma ampla faixa de pH, que varia entre 4,3 até 9,4 e suporta temperaturas que vão dos 4°C aos 45°C. Além disso, a bactéria pode sobreviver por longos períodos em concentrações de NaCl de até 40% e apresenta capacidade de desenvolvimento em concentração de 10%, a maior parte dos alimentos prontos para consumo possui concentrações de NaCl que variam de 2 a 5% (3). A *L. monocytogenes* é altamente adaptada a diferentes ambientes, acomete tanto a humanos quanto a outros mamíferos de sangue quente, é comumente encontrada em fezes de animais, como ruminantes, ovinos e humanos. Além disso, a bactéria também habita locais como solo e vegetais em decomposição e é comumente encontrada em rios, açudes e efluentes agrícolas (4-6).

A listeriose tem como principais síndromes clínicas gastroenterite, meningoencefalite, septicemia, além de causar abortamento e óbito em humanos e animais (2-5). Em ruminantes, é a principal causadora de encefalites bacterianas em países temperados, e a infecção ocorre de forma direta pelo consumo de silagem de baixa qualidade contaminada (5,6).

Os principais reservatórios da *L. monocytogenes* são a água e alimentos prontos para o consumo, como carnes processadas, derivados de leite e produtos frescos, como os encontrados em feiras livres (7). A contaminação de alimentos ocorre de forma cruzada, em equipamentos de corte, processamento ou locais de armazenamento, pois podem aderir a superfícies de contato com alimentos, como aço inoxidável, madeira, poliestireno e vidro, isto ocorre devido a capacidade de algumas cepas de *L. monocytogenes* possuem a capacidade de formação de biofilme (8).

A *L. monocytogenes* pode aderir as mais diversas superfícies, como pisos, tubulações de água, ar-condicionado, e vedações de borracha, que são locais comuns para a formação e acúmulo do biofilme (8). As bactérias com essa capacidade geram complexas estruturas que são inseridas em uma matriz extracelular produzida a partir de substâncias poliméricas, e estas são as responsáveis pela capacidade de adesão. As substâncias poliméricas extracelulares (SPE) permitem que a *L. monocytogenes* apresente resistência a alguns antibióticos, remoção mecânica e a desinfetantes, vale ressaltar que elas não ficam presas as SPE, podendo ficar livres no ambiente, e aumentar assim seu potencial de contaminação e infecção (8, 9). A melhor adaptação ao ambiente industrial por algumas cepas e a relação com a formação de biofilme já foi relatada em estudo (10).

O mecanismo que a *L. monocytogenes* cria o biofilme pode ser iniciado por diversas condições, sendo a principal delas a variação de temperatura na faixa dos 4 a 37°C, a temperatura ideal para formação está em torno de 15°C (11). A resistência associada ao biofilme aumenta quando é formado por espécies mistas de bactérias, que aumenta também o índice de resistência a desinfetantes (12).

Quanto a prevalência da *Listeria monocytogenes* no cenário mundial, fica claro que não se limita a regiões ou países específicos, podendo ser encontrada em qualquer local do mundo, o que inclui suas linhagens e sorotipos (13).

1.2. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

A linhagem I é constituída pelo maior número de sorotipos da *Listeria monocytogenes*, que inclui os sorotipos 1/2b, 3b e 4b (14). As linhagens associadas a estes sorotipos incluem o gene de virulência *prfA* (proteína regulatória da listeriolisina). Além disso, a prevalência da linhagem I de *Listeria* é consideravelmente maior em comparação com a linhagem II, em alimentos (carnes prontas e produtos frescos), os sorotipos isolados da linhagem I eram respectivamente 1/2b, 3b e 4b (14). O sorotipo 4b foi encontrado em várias

amostras de alimentos, o que pode explicar a ocorrência de eventuais surtos de listeriose em todo o mundo (14).

A linhagem II inclui cepas dos sorotipos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c; os sorotipos 1/2c e 3c são mais frequentes em animais; já o sorotipo 1/2a é o mais associado a infecções em seres humanos da linhagem II (14). Em geral as cepas da linhagem II apresentam menor prevalência em humanos, o que provavelmente está relacionado à menor produção do gene *inlA* (Internalina A), isso reduz a virulência das cepas se comparadas com as da linhagem I (14). Ainda, a linhagem III é constituída pelos sorotipos 4a e 4c basicamente, são mais comuns em listeriose animal, algumas das cepas que não pertencem nem ao grupo 4a e ao 4c foram relacionadas a uma linhagem designada como IIIB, posteriormente outros subgrupos derivados da linhagem III passaram a ser utilizados para diferenciar estas cepas, são denominados os subgrupos como IIIA, IIIB e IIIC (14).

É possível que a diferença entre as linhagens da *Listeria monocytogenes* em relação as proteínas de superfície possam definir diretamente sua patogenicidade e habilidade de adaptação aos mais variados meios, o que acaba por torná-la um microrganismo onipresente no ambiente (6). A linhagem I é altamente associada a infecções em mamíferos, além de ser a linhagem com maior prevalência em casos de listeriose em seres humanos, também é causadora da forma encefálica da doença em ruminantes (6,13). Entretanto, estudos indicam a possibilidade de maior viabilidade genética da linhagem II quando comparados à linhagem I (6). Além disso, cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b associadas a surtos envolvendo bovinos, caprinos e equinos podem causar formas graves de listeriose em seres humanos (6,15).

A relação entre complexos clonais e grandes surtos de listeriose é conhecida, o complexo clonal é um grupo de microrganismos geneticamente idênticos, que se multiplicam a partir de um único indivíduo original. Já clone epidêmico se refere ao conceito de uma linhagem que, após o processo de mutação adquire a capacidade de se adaptar, infectar e causar doenças em animais e humanos. Estes clones epidêmicos possuem linhagens que se diferem de cepas não patogênicas, ambas são adaptadas ao meio o que lhes confere

capacidade de sobrevivência em ambientes diversos, os clones epidêmicos apresentam elevado nível de patogenicidade tanto para humanos quanto para animais (14). Portanto, a partir do uso do sequenciamento genético, tem sido possível identificar inúmeros complexos clonais e clones epidêmicos de *L. monocytogenes* relacionados a surtos de listeriose em humanos e animais (6, 7,13,14).

1.3. ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS E MOLECULARES SOBRE *L. monocytogenes* NO BRASIL E NO MUNDO.

Até o presente momento, existem poucos estudos sobre a caracterização genética da *L. monocytogenes* em território brasileiro. Em um estudo sobre contaminação em frango no Distrito Federal foram identificados os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4e, a partir de técnica de sequenciamento genético PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) para análise de amostras de frango refrigerado, a contaminação também estava presente nas embalagens, indicando contaminação cruzada no processamento deste alimento (16). Um estudo sobre o sorotipo 4b em produtos de origem cárnea de amostras isoladas do período de 1972 até 2010 nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Goiás, Pernambuco, Distrito Federal, Mato Grosso e Espírito Santo evidenciou cepas patogênicas, o estudo utilizou PCR para caracterização molecular e PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) para sequenciamento e identificação das cepas encontradas (17). Além disso, foram encontradas cepas de *Listeria monocytogenes* dos sorotipos 1/2b, 3b e 4 (4b, 4d e 4e). O estudo utilizou o PCR em tempo real para identificação das cepas e sequenciamento genético por técnica de PFGE para caracterização mais detalhada dos patógenos, a contaminação foi constatada em 4 das 13 plantas de produção de carne bovina analisadas no estado do Mato Grosso, o maior produtor de carne do Brasil, ainda neste estudo foi avaliada a resistência do patógeno a desinfetantes, foi constatada a resistência a elevadas concentrações de hipoclorito de sódio (18). Estudos como os citados anteriormente não são comuns, a *Listeria monocytogenes* segue sendo um microrganismo esporádico em estudos moleculares em nosso país, o que é diferente do praticado no cenário mundial, onde surtos de listeriose tem se tornado cada vez mais comuns.

Na região de Turim, Itália um surto de Listeriose causado por presunto fatiado foi estudado e cepas do sorotipo 1/2a de *Listeria monocytogenes* foram encontradas (19). Além disso, outro estudo da Itália encontrou contaminação cruzada por *L. monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria ivanovii* em fábrica de presunto (20). Adicionalmente, um estudo sobre a diversidade de *Listeria* spp. em fábricas de alimentos encontrou cepas potencialmente patogênicas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 1/2a em amostras de alimentos prontos para o consumo, além de contaminações em carne bovina e suína (21). Na China um estudo evidenciou cepas patogênicas dos sorotipos 1/2a em amostras de alimentos frescos provenientes de feiras livres (7). No Estados Unidos um estudo sobre a diversidade genética da *L. monocytogenes* encontrou cepas patogênicas dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em fazendas de gado leiteiro (5). Os exemplos supracitados indicam que a listeriose é uma doença relevante para a saúde pública; e no Brasil é uma doença subnotificada em humanos e animais, provavelmente por ser confundível clinicamente, já que as síndromes clínicas similares as de outras doenças infecciosas (2-5, 22).

1.4.LEGISLAÇÃO E NORMATIVAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

A legislação brasileira para segurança alimentar se mostra arcaica se comparada a de outros países, como os Estados Unidos e União Europeia que, estabeleceram regras para seus sistemas de vigilância, a fim de identificar e retirar do mercado produtos que apresentem focos de contaminação (23, 24).

Nos Estados Unidos, a legislação para alimentos é definida pelo FDA (Food and Drug Administration), com tolerância zero para presença de *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para o consumo. De fato, a lei norte americana passa a considerar qualquer alimento contaminado como adulterado, logo, ilegal (23). O FDA ainda criou uma regra que orienta e define diretrizes para a *Listeria monocytogenes* (25), instalada pela norma CFR 10.115, servindo para fiscais, para profissionais da indústria alimentícia e ao público geral. Esta regra

traz métodos, técnicas e orientações sobre como lidar com o patógeno. Quanto a coleta de amostras e identificação o FDA normatiza por meio do B.A.M. (Bacteriological Analytical Manual) todo o procedimento para coleta e identificação da *Listeria* desde o cultivo em meios de cultura até a utilização de PCR, rt-PCR e PFGE, quando necessário (26). Vale lembrar que lotes contaminados deverão ser descartados (27).

Na União Europeia, o regulamento vigente das normas gerais da legislação alimentar (23) define que alimentos contaminados ou que apresentem riscos à saúde de humanos e animais devem ser retirados de comercialização (23). Além disso, a regulamentação nº 2073/2005, acrescenta critérios microbiológicos aplicados a gêneros alimentícios (28). A anexo I da lei 2073/2005 estabelece que em 25g de amostra não seja encontrada *Listeria monocytogenes* (29). A lei 2016/C 278/01 do EUR-LEX estabelece que todos os métodos de análise das amostras devem seguir os padrões do manual HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) que trazem níveis de confiança para a coleta, análise e detecção correta do patógeno, ainda orienta sobre formas de limpeza e desinfecção (29). Além disso, reforçando os métodos de análise em específico para *Listeria monocytogenes* o item 5.2 – Sampling and method of analysis do documento 2005/175/EC da comissão de recomendação indicou para padronização de análise de *Listeria monocytogenes* a utilização da ISO 11290-1/2017, que se baseia na ISO 7278/2007, que posteriormente foi implementado pelo regulamento 1441/2007 que altera a lei N° 2073/2005 e reforça ainda mais os métodos de análise e caracterização microbiológica para as amostras em alimentos, infelizmente não define métodos de biologia molecular para caracterização dos patógenos, limitando-se apenas a testes sorológicos e de cultivo bacteriano (29, 31).

Entretanto, no Brasil a situação é diversa, segundo a Resolução-RDC N° 12, de 02 de janeiro de 2001, que define níveis seguros de microrganismos e toxinas em produtos destinados ao consumo humano. Conforme o item C do tópico 5.8.1 da página 4, assim como na legislação Europeia, as amostras colhidas para análise devem ser negativas para *Listeria monocytogenes* a quantidade de 25g (32). Entretanto, não há menção sobre a questão da mistura

de amostras a cada unidade amostral, sem indicar ações em relação à remoção ou destruição de produtos contaminados com a *L. monocytogenes*. Posteriormente, foi criada a Normativa N° 09, de 8 de abril de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, visando apenas produtos prontos para o consumo (33). Posteriormente, houve atualização dessa norma em 2013, estabelecendo que os produtos devem ser analisados, excluindo assim suas matérias primas, e segundo no Art. 9º, página 2 da normativa, o reprocessamento de produtos com contaminação confirmada pela bactéria *Listeria monocytogenes* é permitido, quando deveria ser destruído para evitar contaminações futuras (34). Ainda sobre a fragilidade da legislação, o §1º, página 2, exige o procedimento de análise microbiológica para assegurar a ausência do patógeno nos produtos reprocessados, mas não cita quais testes devem ser realizados, deixando aberta a possibilidade de interpretações (34).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a bactéria *Listeria monocytogenes* de ambiente rural e seus locais relacionados.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar o gênero *Listeria* de ambientes rurais do estado de São Paulo a partir do cultivo bacteriano em meios de seletivos Caldo Demi-Fraser e ágar *Listeria* Oxford
- Confirmar gênero e espécie de *Listeria monocytogenes*, bem como seus principais sorotipos, do ambiente rural, a partir do ensaio de PCR Multiplex
- Verificar possível resistência aos antimicrobianos amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, canamicina, tetraciclina e vancomicina das amostras confirmadas como gênero e espécie de *Listeria monocytogenes*, bem como seus principais sorotipos, a partir do ensaio de PCR Multiplex
- Verificar possível correlação estatística entre as variáveis de resistência e susceptibilidade aos antimicrobianos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. AMOSTRAGEM, ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO E COMISSÃO DE ÉTICA ANIMAL.

Para a amostragem, os critérios de inclusão foram: propriedades rurais localizadas no estado de São Paulo, que possuíssem animais domésticos e fontes de água corrente (Figura 1). Os critérios de exclusão foram: propriedades urbanas, ausência de animais domésticos e de fontes de água.

O presente estudo foi baseado a partir de estudos anteriores (6, 15, 18, 31, 35, 36, 37, 38), bem como na norma ISO 11290-2:2017, que padroniza os métodos de cultivo e semeio da bactéria *Listeria monocytogenes*, foi definido o método de semeadura em campo (31). O método adotado não deseja avaliar a carga bacteriana presente no local, o objetivo é detectar os patógenos presentes no ambiente e possibilitar posteriormente a caracterização molecular. Para o isolamento microbiológico, foram realizadas duas etapas com meios de cultivo bacteriano seletivos distintos, para uma maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos resultados (31).

A primeira coleta foi realizada no dia 24/09/2020, em 2 sítios na região de São José dos Campos. Foram utilizados *swabs* estéreis para coleta das amostras. Os *swabs* contendo as amostras foram submergidos em tubos tipo Falcon de 15ml, que foram devidamente preenchidos com meio de cultura líquido seletivo para *Listeria* (caldo Demi-Fraser) e armazenados a 4°C para transporte até o centro de pesquisas da UNIP, em São Paulo, SP. Posteriormente, as amostras foram incubadas em estufa microbiológica a 37° por 48h (31). Em seguida, todas as amostras positivas foram isoladas em placas contendo meio seletivo ágar *Listeria* Oxford, repetindo o processo de incubação em estufa a 37° por 48h (31).

A presença e crescimento de *Listeria monocytogenes* nos meios seletivos supracitados induz ao escurecimento dos meios de cultivo (Figura 2B), isto ocorre devido à presença da enzima β -glucosidase, presente em todas as *Listeria* spp. que hidrolisam o composto cromogênico presente no caldo Demi-Fraser, que em estado estéril possui coloração amarelada (31).

O meio de cultura *Listeria* Oxford também sofre alteração de cor em meio ao crescimento de *Listeria* spp. (Figura 2), pois possui as mesmas propriedades de composição cromogênica que o caldo Demi-Fraser (31). O escurecimento do meio de cultura *Listeria* Oxford ao redor da área semeada, além da observação de colônias de cor acinzentada, e com textura rugosa ou leitosa, em toda a extensão da semeadura, são características esperadas apresentadas por *Listeria* spp (31).

Adicionalmente, o presente estudo foi submetido e aprovado pela comissão de ética animal (CEUA) da UNIP, por se tratar de estudo que utilize amostras biológicas de animais domésticos, mesmo sem ter causado qualquer tipo de dor ou mal trato, sob número 4094210519.

Figura 1 – Foto de bebedouro automático da propriedade rural 1.



Legenda: observe a água turva, um dos locais de interesse onde foi realizada a coleta com swab. Posteriormente a amostra coletada deste local foi confirmada como *Listeria monocytogenes*, confirmando um foco de contaminação. Fonte: Autor, 2020.

3.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

De acordo com a literatura científica, foi definida metodologia utilizada para a realização do Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos (TSA) para gênero *Listeria* spp., e *Listeria monocytogenes*, utilizando a técnica de Kirby & Bauer, recomendada pela Anvisa, CLSI (Instituto de Padrões Clínicos e

Laboratoriais) e por diversos fabricantes de antibióticos voltados para técnicas de disco-difusão (39, 40).

Foram selecionados 8 antibióticos relevantes acerca das *Listeria* spp., sendo eles Amoxicilina (AMO), Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERI), Gentamicina (GEN), Kanamicina (KAN), Tetraciclina (TET) e Vancomicina (VAN) (18, 41, 42, 43, 44).

Foi coletada uma colônia bacteriana diretamente da placa de cultivo de *Listeria* Oxford e/ou meio caldo *brain heart infusion* (BHI), e semeada em caldo *Mueller Hinton* para a adequação a escala 0,5 de *McFarland*. Posteriormente, a semeadura seguiu em placas contendo Ágar *Mueller Hinton*, que foi acrescido dos discos de antibióticos, com repouso em estufa por 24h (40).

3.3. ANÁLISE MOLECULAR

Os sorotipos foram confirmados por meio de PCR multiplex, conforme previamente descrito (46). Os genes marcadores selecionados para o ensaio de PCR multiplex foram *prs*, *lmo0737*, *ORF2819* e *ORF2110*, utilizados para identificar os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b de cepas de *L. monocytogenes*, de acordo com a bibliografia (46). As sequências dos primers utilizados na reação podem ser visualizadas na tabela 1:

Tabela 1 – Genes, oligonucleotídeos iniciadores (primers), sequências “forward” e “reverse” dos primers, peso molecular aferido em pares de bases (bp) e sorotipos que cada primer revela.

GENE ALVO	SEQUÊNCIA DO PRIMER	PESO MOLECULAR (BP)	GÊNERO <i>LISTERIA</i> spp. E SOROTIPOS DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>
<i>prs</i>	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev: CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370bp	<i>Listeria</i> spp.
<i>orf 2819</i>	For: AGCAAAATGCCAAACTCGT Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG	471bp	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
<i>orf 2110</i>	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC	597bp	4b, 4d e 4e

Imo 0737	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC Ser: ACGATTCTGCTTGCCATTC	691bp	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
----------	---	-------	---------------------

Fonte: Extraído de 46.

Resumidamente, a reação de cadeia em polimerase (PCR) multiplex foi realizada em reações de 50µl, contendo 75mM de Tris-HCl (pH 8,8); 1 unidade da enzima recombinante Taq DNA polimerase (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil); 0,2µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Life Technologies, São Paulo); 1µM de cada par de primers descritos na Tabela 2; 1,5mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); e 60ng de DNA extraído de cada amostra. A reação de PCR foi realizada a partir do primeiro ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos; posteriormente, 35 ciclos foram executados com as seguintes temperaturas: desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 53°C por 1,15 minutos, e extensão a 72°C por 1,15 minutos; a extensão final foi realizada a 72°C por 7 minutos. O termociclador utilizado foi o Mastercycler gradiente (Eppendorf, Alemanha). Posteriormente, 5µl dos produtos amplificados foram misturados com 1µl do tampão da amostra, que contém reagente fluorescente na luz ultravioleta (Orange Loading Dye, 6X, cod. G1881, Kasvi, São Paulo, Brazil). A mistura desses reagentes foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen, Carlsbad, CA), a 120V por 70 minutos com tampão de corrida do gel 1X Tris acetato do ácido etilenediaminetetraacético (pH 8,3). Os produtos amplificados foram visualizados com transiluminador ultravioleta (Kasvi, São Paulo, Brazil), e os pesos moleculares foram comparados com padrão molecular de pares de bases de DNA (bp) (1Kb, DNA Ladder, Kasvi). O controle negativo da reação de PCR multiplex foi o mix do PCR misturado com água ultrapura, que foi submetida as mesmas condições dos ensaios descritos acima. O controle positivo foi o DNA extraído de uma amostra de *Listeria monocytogenes* ATCC19112, guardada em repositório a -80°C.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

Todos os experimentos de difusão em ágar foram realizados em triplicata. A análise estatística e construção dos gráficos foi realizada com o software GraphPad Prisma 8.0 (47). Os resultados da média dos halos obtidos para a análise da resistência e sensibilidade a determinado antibiótico, foram comparados em tabelas individuais nos testes de ANOVA de duas vias, considerando o grau de sensibilidade e resistência de cada antibiótico. Em seguida, foi realizado o teste de comparação múltipla de Bonferroni (47).

4. RESULTADOS

4.1. ISOLAMENTO MICROBIOLÓGICO

Houve crescimento nos meios seletivos Figura 2 e 3) na maioria das amostras coletadas, e a tabela 2 apresenta mais detalhes sobre a origem das coletas das amostras ambientais. Além disso, estão apresentados os resultados do isolamento microbiológico.

Os resultados do presente estudo demonstraram um alto percentual de amostras positivas no isolamento microbiológico (93%).

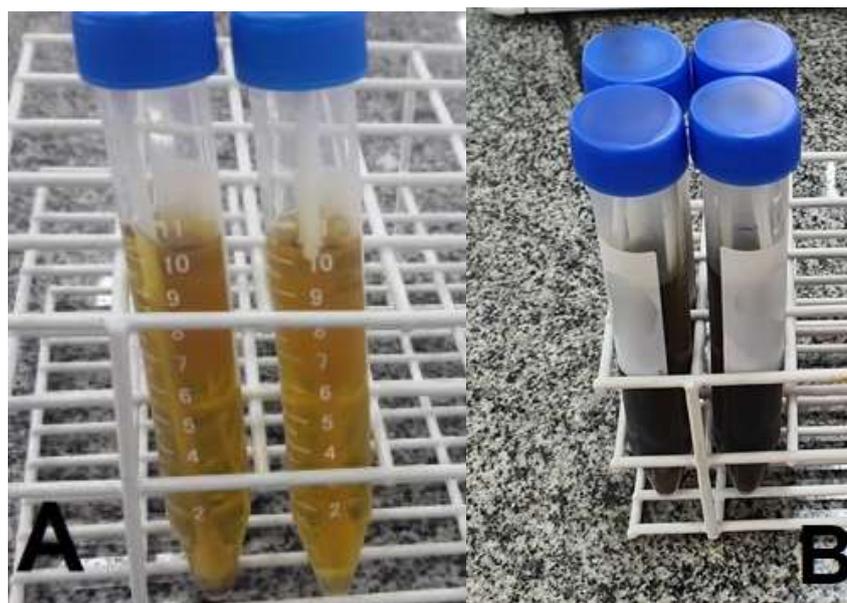
Tabela 2 – Locais de coleta das amostras ambientais, com respectivos resultados dos meios seletivos de cultivo utilizados.

Nº	Grupo	Descrição	Demi-Fraser	L. Oxford
A01	2	Curral – Silagem	P	P
A02	2	Curral – Coxo	P	P
A03	3	Curral – Chão	P	P
A04	1	Curral – Esterco bovino velho	P	P
A05	1	Curral – Esterco cavalo fresco	P	P
A06	1	Curral – Esterco bovino fresco	P	P
A07	3	Curral – Sedimentos	P	P
A08	4	Bebedouro 1	P	P
A09	3	Galinheiro – Poleiro	P	P
A10	2	Galinheiro – Comedouro	P	P
A11	4	Galinheiro – Bebedouro	P	P
A12	1	Galinheiro – Esterco	P	P
A13	3	Bebedouro 2 – Solo	P	P
A14	4	Bebedouro 2 – Bebedouro	P	P
A15	4	Água do Poço	N	N
A16	3	Chão – Limite Pastagem	P	P
A17	3	Chão – Mata 1	P	P
A18	3	Chão – Mata 2	P	P
A19	3	Reservatório seco	P	P
A20	1	Curral – Esterco bovino	P	P
A21	4	Água – Bebedouro	P	P
A22	2	Curral – Silagem	P	P
A23	4	Curral – Leite	P	P
A24	2	Curral – Coxo	P	P
A25	3	Curral – Ambiente	P	P
A26	2	Coxo 1 – Sal mineral	N	N
A27	2	Coxo 2 – Silagem	P	P

A28	1	Água – Suínos	P	P
A29	1	Pasto – Esterco cavalo	P	P
A30	1	Pasto – Esterco bovino	P	P
A31	1	Esgoto – Esterco suínos	P	P

Legenda: **P**: Positivo. **N**: Negativo, A: Designação para diferenciação entre amostras coletadas. Grupo 1: esterco, grupo 2: ração/silagem, grupo 3: ambiental e grupo 4: água/leite. Fonte: Autor, 2020.

Figura 2 – Meios de cultura seletivos caldo Demi-Fraser.



Legenda: Na figura 1 A o tubo sem crescimento de *Listeria* spp., à esquerda na figura 1 B com o crescimento de *Listeria* spp. e alteração de coloração do meio de cultura. Fonte: Autor, 2020.

Figura 3 – Meios de cultivo seletivos ágar Listeria Oxford semeados a partir das amostras de ambiente rural.



Legenda: observe a reação cromogênica pode ser observada na parte superior da placa, com o escurecimento e crescimento de culturas de bactérias do gênero *Listeria*. Na figura, a foto da

placa correspondente a amostra A30, posteriormente confirmada como *Listeria monocytogenes*.
Fonte: Autor, 2020.

4.2. TESTE DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os resultados dos testes de disco-difusão somente das amostras positivas no PCR estão apresentados na tabela 3: Foi observada resistência a Amoxicilina (AMO), Ampicilina (AMP), Ciprofloxacina (CIP), Eritromicina (ERI), Canamicina (KAN), Tetraciclina (TET) e Vancomicina (VAN) em diversas amostras (tabela 3). Particularmente, foi observada sensibilidade ao antibiótico gentamicina em todas as amostras, entretanto, foi observada maior resistência aos antibióticos amoxicilina e ampicilina na maioria das amostras.

Tabela 3 – Resultados dos antibiogramas das amostras, apresentando padrões de resistência ou susceptibilidade.

Amostras	AMO	AMP	CIP	ERI	GEN	KAN	TET	VAN
A04	R	R	R	R	S	S	S	R
A05	R	R	S	R	S	S	S	R
A06	R	R	S	S	S	S	S	S
A07	R	R	S	R	S	R	R	R
A08	S	S	S	S	S	S	S	S
A09	S	S	S	R	S	S	R	S
A11	S	S	R	R	S	R	R	R
A14	R	R	S	S	S	S	S	S
A16	R	R	R	S	S	R	R	R
A17	S	S	S	S	S	S	S	S
A20	R	R	S	R	S	S	S	R
A22	S	S	S	R	S	S	R	S
A24	R	R	S	S	S	S	S	S
A25	R	R	S	S	S	R	S	S
A28	S	S	R	R	S	S	R	R
A30	R	R	S	S	S	R	R	R

Legenda: **R**: Resistente / **S**: Suscetível. Os dados brutos estão no anexo II. Fonte: Autor, (2021); BrCast/EUCAST, (2019).

Figura 4 – Placa de petri contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton para o teste de antibiograma.



Legenda: Teste de disco-difusão demonstrando a formação de um pequeno halo, confirmando a resistência ao medicamento Ampicilina. A amostra A30 foi confirmada como sendo *Listeria monocytogenes* pertencente ao sorotipo 1/2a. Fonte: Autor, 2021.

4.3. ANÁLISE MOLECULAR

A tabela 4 apresenta os resultados da PCR multiplex para *Listeria* e *L. monocytogenes*, com seus respectivos sorotipos identificados. Posteriormente o PCR confirmou que 53% das amostras positivas no isolamento microbiológico pertenciam ao gênero *Listeria* spp., e destes 50% foram classificados apenas como *Listeria* spp. (46). Porém, mais das amostras pertencentes à espécie *L. monocytogenes* 43% foram caracterizados como pertencentes ao sorotipo 1/2a; um isolado foi classificado como sorotipo 1/2b, porém como não ocorreu reação positiva do primer *prs* este resultado precisará ser confirmado posteriormente.

Tabela 4 – Resultados da PCR multiplex para triagem e caracterização das cepas de *Listeria* spp e *L. monocytogenes*.

Amostra	Grupo	PRS	ORF 2819	ORF 2110	LMO 0731	Sorotipo
A01	2	N	N	N	N	N
A02	2	N	N	N	N	N
A03	3	N	N	N	N	N
A04	1	P	N	N	N	spp.
A05	1	P	N	N	N	spp.
A06	1	P	N	N	P	1/2a
A07	3	P	N	N	N	spp.

A08	4	P	N	N	P	1/2a
A09	3	P	N	N	N	spp.
A10	2	N	N	N	N	N
A11	4	P	N	N	N	spp.
A12	1	N	N	N	N	N
A13	3	N	N	N	N	N
A14	4	P	N	N	N	spp.
A16	3	P	N	N	N	spp.
A17	3	P	N	N	P	1/2a
A18	3	N	N	N	N	N
A19	3	N	N	N	N	N
A20	1	N	N	N	P	*1/2a
A21	4	N	N	N	N	N
*A22	2	N	P	N	N	1/2b
A23	4	N	N	N	N	N
A24	2	P	N	N	P	1/2a
A25	3	P	N	N	P	1/2a
A27	2	N	N	N	N	N
A28	4	P	N	N	N	spp.
A29	1	N	N	N	N	N
A30	1	P	N	N	P	1/2a

Legenda: **P**: Positivo, **N**: Negativo, Sorotipo 1/2a: prs + lmo0737, 1/2b: prs+orf2819, spp.: prs.

Fonte: Autor, 2020.

Oito amostras foram caracterizadas pelo PCR multiplex como *Listeria* spp., sete pertencentes ao sorotipo 1/2a e 1 como sorotipo 1/2b. Os resultados foram distribuídos entre os 4 grupos de amostras, conforme tabelas 2 e 4.

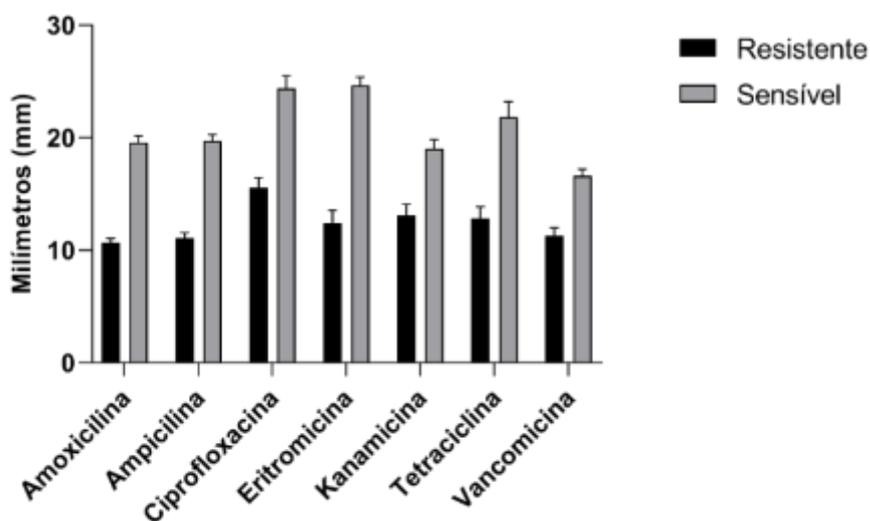
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TESTE DE DISCO-DIFUSÃO

Os resultados do antibiograma revelaram diferenças significantes entre os antibióticos [F (6, 98) = 9,363; p<0,0001], com grau de sensibilidade [F (1, 98) = 272,3; p<0,0001] havendo, também interação entre os fatores [F (6, 98) = 3,000; p=0,0098]. O teste de comparações múltiplas de Bonferroni revelou que os níveis de sensibilidade da Amoxicilina (p<0,0001****), Ampicilina (p<0,0001****), Ciprofloxacina (p<0,0001****), Eritromicina (p<0,0001****), Kanamicina (p=0,0037**), Tetraciclina (p<0,0001****) e Vancomicina (p=0,0068**) foram distintamente diferentes dos níveis de resistência. Também foram revelados níveis distintos de sensibilidade entre Amoxicilina vs.

Ciprofloxacina ($p=0,0288^*$), Ampicilina vs. Ciprofloxacina ($p=0,00423^*$), Ciprofloxacina vs. Kanamicina ($p=0,0003^{***}$), Ciprofloxacina vs. Vancomicina ($p=0,0001^{****}$), Eritromicina vs. Kanamicina ($p=0,0016^{**}$), Eritromicina vs. Vancomicina ($p<0,0001^{****}$) e Tetraciclina vs. Vancomicina ($p=0,0169^*$).

Gráfico 1 – Comparativo entre antibióticos das amostras positivas do PCR para *Listeria* spp.

Comparativo entre antibióticos e sensibilidade



Legenda: Análise de variância (ANOVA) de duas vias entre antibióticos e sensibilidade. Dados expressos em média \pm SEM (resistentes: amo n=10, amp n=10, cip n=4, eri n=9, kan n=5, tet n=9, van n=8; sensíveis: amo n=6, amp n=6, cip n=12, eri n=7, kan n=11, tet n=7, van n=8).

5. DISCUSSÃO

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno cosmopolita, principal causador da listeriose, doença que provocou diversos surtos associados a contaminação de alimentos em todo o mundo, e os principais reservatórios são os locais de alimentação e circulação de animais, pasto, esterco, silagem, rios e açudes, dentre outros locais relacionados ao ambiente rural (06, 15, 37). Esses patógenos ainda são frequentemente encontrados em fábricas de produção de carne e leite, alimentos frescos provenientes de feiras livres e prontos para o consumo (5, 7, 18, 19, 37).

Alguns destes surtos de listeriose em ruminantes relacionados ao ambiente rural foram estudados com a análise filogenética do patógeno, demonstrando que cepas patogênicas foram relacionadas a casos de encefalite em ruminantes na Itália (6). Na Eslovênia, cepas patogênicas foram identificadas em caprinos após um surto de listeriose, e os isolados foram geneticamente relacionados à água e esterco em regiões próximas ao local de origem do surto (15). Além disso, outro caso de surto de listeriose em ovelhas identificou, cepas patogênicas em amostras de água, silagem e solo na Suíça (37). Já com relação aos alimentos e fábricas relacionadas, cepas patogênicas pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b foram identificadas em fábrica de produção de leite nos Estados Unidos (5). Ainda, isolados com potencial patogênico do sorotipo 1/2a foram encontrados em alimentos frescos provenientes de feiras livres na China e Itália (7,19). Já no Brasil, foram encontradas em frigoríficos cepas potencialmente patogênicas, em sua maioria do sorotipo 4b (18).

Os presentes resultados indicaram que cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2a estão presentes em diversos locais relacionados ao ambiente rural, os isolados deste sorotipo foram mais prevalentes em amostras relacionadas a esterco (grupo 1) ração (grupo 2) e locais de circulação de animais como currais e pastos (grupo 3). Os isolados caracterizados como *Listeria* spp. foram mais prevalentes amostras de água (grupo 4), demonstrando que estes são reservatórios para o desenvolvimento de cepas potencialmente patogênicas, corroborando com a literatura científica (15, 37).

A linhagem II abriga o sorotipo 1/2a um dos mais comumente associados a casos de listeriose humana, estas cepas são frequentemente encontradas em contaminação de alimentos e água (14), bem como foi demonstrado nos resultados sobre a prevalência dos isolados em esterco e locais de circulação de animais. Já o sorotipo 4b tem sido identificado em casos clínicos humanos e animais de listeriose (5, 6, 16, 17, 18). Interessantemente, os isolados da linhagem II tem demonstrado maior resistência a antibióticos e a metais pesados (50). Na Bélgica e Chile, um estudo revelou relação do consumo de carne mal processada contaminada com *Listeria monocytogenes*, o que corrobora com a predominância (95%) dos sorotipos 1/2^a, 1/2b e 4b demonstrada nos estudos citados anteriormente (51,52). Além disso, a importância do sorotipo 1/2a pode ser constatada em diversos estudos sobre ambiente rural, alimentos, água e até mesmo na influência geográfica sobre o desenvolvimento do patógeno no meio (15, 38, 53).

Alguns sorotipos da *Listeria* possuem melhor adaptação ao ambiente industrial, pode ser observada em cepas 1/2a, 1/2b e 1c, comumente encontradas nestes ambientes, enquanto sorotipos 1/2c apresentam maior tendência para formação de biofilme e fixação em superfícies de aço inoxidável (10). A capacidade de formação de biofilme e pré-disposição genética por parte de cepas pertencentes aos sorotipos 1/2a, pode ser relacionada a genes de virulência característicos do gênero *Listeria* spp., vale lembrar que estes biofilmes podem abrigar bactérias das mais diversas espécies e gêneros, o que aumenta a resistência dos patógenos a desinfetantes e antibióticos (4, 12). Conforme demonstrado em estudos anteriores, este fator de virulência confere grande vantagem as *Listeria* spp. na capacidade de desenvolvimento nos mais diversos ambientes e temperaturas (11,12, 37). Cabe ainda considerar a possibilidade de verificação da presença dos genes de virulência relacionados a formação de biofilme, em estudos futuros.

O ecossistema de fazendas de criação de gado e produção de leite tem alta prevalência de *Listeria monocytogenes*, incluindo ainda sorotipos associados a listeriose humana (6, 15, 36, 37, 48). No Brasil estudos moleculares acerca da *Listeria monocytogenes* têm sido realizados, os resultados sobre

contaminação de alimentos identificaram cepas patogênicas do sorotipo 4b relacionadas a casos de listeriose causada por carne processada (17). Além disso, cepas dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b em carnes bovina e de frango congelado foram identificados como do sorotipo 1/2a (16, 18, 49).

Com foco em amostras provenientes de locais relacionados ao ambiente rural, os resultados mostraram que esterco, junto a áreas de circulação de animais, que são os pontos com maior contaminação por *Listeria* spp e *Listeria monocytogenes*, o que não anula a presença do patógeno em ração e silagem ou mesmo em água. A umidade do solo e a proximidade da água com pastagens tem se mostrado fator decisivo para o desenvolvimento do patógeno (53). Estudos anteriores pontuaram que rios e açudes são reservatórios naturais para cepas potencialmente patogênicas de *Listeria monocytogenes* (37).

A resistência e a sensibilidade de *Listeria* spp. a antibióticos têm sido investigadas pela literatura científica (18, 41, 42, 43, 44). Os resultados do presente estudo sobre a sensibilidade ao antibiótico gentamicina em todas as amostras estão de acordo com a literatura científica. Entretanto foi observada maior resistência ao antibiótico vancomicina (43). As proteínas de ligação a penicilina da *Listeria monocytogenes* são constituintes da parede celular, que são alvos dos antibióticos beta-lactâmicos. A resistência a ampicilina é infrequente; por exemplo, um estudo da China não encontrou resistência em 2862 amostras caracterizadas (45). A Eritromicina é usada no tratamento de gestantes com listeriose, foi observada resistência a este fármaco em 8 das 16 amostras testadas (43). A resistência a Tetraciclina constatada nos resultados de 7 amostras testadas não é algo incomum nas bactérias do gênero *Listeria* spp. (43).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo sugerem que cepas potencialmente patogênicas de *Listeria monocytogenes*, identificadas como sorotipos 1/2a e 1/2b, apresentaram resistência a antimicrobianos de ampla utilização como amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina tetraciclina e vancomicina.

Além disso, os resultados do presente estudo sugerem que o ambiente rural é um potencial reservatório de cepas patogênicas de *L. monocytogenes*, indicando necessidade de atualização e melhorias das normas sanitárias exigidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil para detecção e caracterização da *L. monocytogenes*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wagner M, McLauchlin J. Biology. In: Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1th. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 3-12.
2. Narayanan S. *Listeria*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM. Veterinary Microbiology. 3th. Iowa: Wiley-Blackwell; 2013. p. 223-224.
3. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1th. Boca Raton: CRC Press; 2008. Chapter 2, Epidemiology. p. 38.
4. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1th. Boca Raton: CRC Press; 2008. Chapter 2, Epidemiology. p. 29–30.
5. Kim SW, Haendiges J, Keller EN, Myers R, Kim A, Lombard JE, et al. Genetic diversity and virulence profiles of *Listeria monocytogenes* recovered from bulk tank milk, milk filters, and milking equipment from dairies in the United States (2002 to 2014). PLoS One. 2018;13(5): 1–4.
6. Rocha PRD, Dalmaso A, Grattarola C, Casalone C, Del Piero F, Bottero MT, et al. Ruminant Rhombencephalitis-Associated *Listeria monocytogenes* Strains Constitute a Genetically Homogeneous Group Related to Human Outbreak Strains. Appl Environ Microbiol. 2013;79(9): 3060–3064.
7. Zhang Y, Dong S, Chen H, Chen J, Zhang J, Zhang Z, et al. Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. Front. Microbiol. 2019;10: 1710.

8. Colagiorgi A, Bruini I, Di Ciccio PA, Zanardi E, Ghidini S, Ianieri A. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens*. 2017;6(3): 3–5.
9. Møretrø T, Schirmer BCT, Heir E, Fagerlund A, Hjemli P, Langsrud S. Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. *Int J Food Microbiol*. 2017;241: 216–222.
10. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1th. Boca Raton: CRC Press; 2008. Chapter 2, Epidemiology. p. 30.
11. Piercey MJ, Hingston PA, Truelstrup Hansen L. Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant temperature of 15° C. *Int J Food Microbiol*. 2016;223: 63-74.
12. Van der Veen S, Abee T. Mixed Species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int J Food Microbiol*. 2011;144(3): 421–431.
13. Francisque VC, Lopez J, Cantinelli T, Caro V, Tran C, Leclercq A, et al. Worldwide Distribution of Major Clones of *Listeria monocytogenes*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(6): 1110–1112
14. Cheng Y, Siletzky RM, Kathariou S. Genomic Divisions/Lineages, Epidemic Clones, and Population Structure In: Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes*. 1th. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 339-342.

15. Papić B, Kušar D, Zdovc I, Golob M, Pate M. Retrospective investigation of listeriosis outbreaks in small ruminants using analytical approaches for whole genome sequencing-based typing of *Listeria monocytogenes*. *Infect Genet Evol.* 2019;77: 104047.
16. Mendonça KS, Michael GB, Nalério ÉS, Mendonça M, Cardoso MRI, da Silva WP. Genotypic profile of *Listeria monocytogenes* isolated in refrigerated chickens in southern Rio Grande do Sul. *Cienc Rural.* 2015;46(1): 134–135.
17. Barbosa AV, Cerqueira AMF, Rusak LA, dos Reis CMF, Leal NC, Hofer E, et al. Characterization of epidemic clones of *Listeria monocytogenes* serotype 4b isolated from humans and meat products in Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9: 962-969.
18. Teixeira LAC, Carvalho FT, Vallim DC, Pereira RCL, Cunha Neto A, Carvalho RCT, et al. *Listeria monocytogenes* in Export-approved Beef from Mato Grosso, Brazil: Prevalence, Molecular Characterization and Resistance to Antibiotics and Disinfectants. *Microorganisms.* 2019;8(1): 18.
19. Maurella C, Gallina S, Ru G, Adriano D, Bellio A, Bianchi DM, et al. Outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* 1/2a in sliced cold beef ham, Italy, May 2016. *Euro Surveill.* 2018;23(10): 17-0015.
20. Conficoni D, Santagiuliana M, Marchesan M, Franceschini F, Catellani P, Ferioli M, et al. Distribution of *Listeria* spp. on Carcasses of Regularly Slaughtered Swine for Italian Dry Cured Ham. *J Food Prot.* 2019;82(7): 1104–1109.

21. Rossi F, Amadoro C, Conficoni D, Giaccone V, Colavita G. Occurrence, Diversity of *Listeria* spp. Isolates from Food and Food-Contact Surfaces and the Presence of Virulence Genes. *Microorganisms*. 2020;8(2): 294.
22. Headley AS, Bodnar L, Fritzen JTT, Bronkhorst DE, Alfieri AF, Okano W, et al. Histopathological and molecular characterization of encephalitic listeriosis in small ruminants from northern Paraná, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2013;44(3): 889–896.
23. Food and Drug Administration. U.S. Code. Title 21, - Food and Drugs, Chapter 9 – Federal Food, Drugs, and Cosmetic ACT, Subchapter IV – Food, Act Sec. §342 – Adulterated Foods. Washington; 2005. p.1–3.
24. EUR-Lex. European Parliament and of the Council. Regulation (EC). N°178/2002 Laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. The European Parliament and the Council of the European Union; 2002. p.1–40.
25. Food and Drugs Administration. Control of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods: Revised Draft Guidance for Industry; Availability - FDA–2007–D–0494. Washington; 2017. p.2–6.
26. Food and Drugs Administration. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 10, *Listeria monocytogenes* – Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Washington; 2017. p.1–15.

27. Food and Drug Administration. U.S. Code. Title 21, - Food and Drugs, Chapter 1, Subchapter B – Food for Human Consumption. Sec.117.139 – Recall plan. Food and Drug Administration. Washington; 2019. p.1
28. EUR-Lex. Commission Regulation (EC). N°2073/2005 On microbiological criteria for foodstuffs. The Commission of the European Communities; 2005. p.9.
29. EUR-Lex. Commission Recommendation. 2005/175/EC Concerning a coordinated programme for the official control of foodstuffs for 2005. Official Journal of the European Union; 2005. p.2–3.
30. EUR-Lex. Commission Regulation (EC). N°1441/2007 Amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. The Commission of the European Communities.; 2007. p.4.
31. International Organization for Standardization. ISO 11290-2:2017. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. 2017.
32. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC N° 12, de 02 janeiro de 2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos Para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília; 2001. p.4
33. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 9, de 08 de abril de 2009. Procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo. Brasília; 2009. p.1–3.

34. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Norma Interna DIPOA/DAS nº 1, de 09 agosto de 2013. Procedimentos complementares à Instrução Normativa Nº 9, de 8 de abril de 2009, definindo procedimentos para coleta oficial de amostras para o controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo a serem adotados pelo Serviço de Inspeção Federal. Brasília; 2013. p.1.
35. Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and United States. *Infect Genet Evol.* 2015; 35: 172-83.
36. Haley BJ, Sonnier J, Schukken YH, Karns JS, Van Kessel JAS. Diversity of *Listeria monocytogenes* Within a U.S. Dairy Herd, 2004–2010. *Foodborne Pathog Dis.* 2015;12(10): 844-50.
37. Dreyer M, Thomann A, Böttcher S, Frey J, Oevermann A. Outbreak investigation identifies a single *Listeria monocytogenes* strain in sheep with different clinical manifestations, soil and water. *Vet Microbiol.* 2015;179(1-2): 69-75.
38. Maury M.M, Bracq-Dieye H, Huang L, Vales G, Lavina M, Thouvenot P, et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaptation to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun.* 2019;10(1): 2488.
39. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma M2-A8. – Oitava

Edição. São Paulo. Organização Pan-Americana da Saúde. 2003. Vol. 23 N° 1.

40. Laborclin. Manual Antibiograma 2019. BrCast/EUCAST: 01 de fevereiro de 2019. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Manual-Antibiograma-BRCAST-2019.pdf>
41. Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis.* 2005;2(3): 201-11.
42. Manso B, Melero B, Stessl B, Fernández-Natal I, Jaime I, Hernández, et al. Characterization of virulence and persistence abilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food processing premises. *J Food Prot.* 2019;82(11): 1922-1930.
43. Baquero F, Lanza V, Duval M, Coque TM. Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology.* 2020;113(3): 570-579.
44. Lungu B, O'Bryan CA, Muthaiyan A, Milillo SR, Johnson MG, Crandall PG, et al. *Listeria monocytogenes*: antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(5): 569-78.
45. Yan S, Li M, Luque-Sastre L, Wang W, Hu Y, Peng Z, et al. Susceptibility (re)-testing of a large collection of *Listeria monocytogenes* from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(7): 1786-1794.

46. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8): 3819–3822.
47. Dias CP. ANÁLISE DA PRESENÇA DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS EM SISTEMA DE TRATAMENTO DE DEJETOS DE SUINOCULTURA [dissertação]. Universidade Federal De Ouro Preto. 2018 [citado 2021 jun. 18]. Disponível em: https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/10612/1/DISSETA%C3%87%C3%83O_An%C3%A1lisePresen%C3%A7aBact%C3%A9rias.pdf
48. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, et al. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(8): 4458–4467.
49. Palma JM, Lisboa RC, Rodrigues DP, Santos AFM, Hofer E, Santana AP. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 2016; 36(10): 957–964.
50. Orsi RH, Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(2): 79-96.
51. Bertrand S, Ceysens PJ, Yde M, Dierick K, Boyen F, Vanderpas J, et al. Diversity of *Listeria monocytogenes* Strains of Clinical and Food Chain Origins in Belgium between 1985 and 2014. *PLoS One.* 2016;11(10): e0164283.

52. Montero D, Bodero M, Riveros G, Lapierre L, Gaggero A, Vidal RM, et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. *Front Microbiol.* 2015;6: 384.
53. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria* species in New York State produce production and natural environments. *J Food Prot.* 2014;77(11): 1919-1928.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO I

Tabela 5 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para *Listeria* spp..

Amostra 12/06	Antibiótico	Sensível	Resistente	Resultado	Resistência
A04a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A04a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	11	Resistente
A04a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	15	Resistente
A04a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A04a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	16	Sensível
A04a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A04a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	17	Intermediário
A04a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	9	Resistente
A05a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	8	Resistente
A05a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	11	Resistente
A05a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	25	Sensível
A05a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	12	Resistente
A05a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	21	Sensível
A05a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A05a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	17	Intermediário
A05a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A06a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A06a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	11	Resistente
A06a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	22	Sensível
A06a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	26	Sensível
A06a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	24	Sensível
A06a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A06a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	19	Sensível
A06a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	17	Sensível
A07a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A07a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	14	Resistente
A07a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	18	Intermediário
A07a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A07a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A07a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A07a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	11	Resistente
A07a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A08a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	18	Sensível
A08a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	20	Sensível

A08a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	30	Sensível
A08a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	26	Sensível
A08a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	22	Sensível
A08a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A08a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	25	Sensível
A08a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	20	Sensível
A09a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A09a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	19	Sensível
A09a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	22	Sensível
A09a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	18	Intermediário
A09a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A09a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A09a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	8	Resistente
A09a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A11a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A11a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	21	Sensível
A11a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	14	Resistente
A11a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	8	Resistente
A11a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	15	Sensível
A11a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	12	Resistente
A11a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	8	Resistente
A11a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	9	Resistente
A14a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	8	Resistente
A14a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	8	Resistente
A14a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	23	Sensível
A14a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A14a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	20	Sensível
A14a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A14a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	23	Sensível
A14a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	16	Sensível
A16a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A16a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	11	Resistente
A16a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	18	Intermediário
A16a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A16a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A16a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	12	Resistente
A16a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	13	Resistente
A16a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	11	Resistente
A17a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A17a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	16	Sensível
A17a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	28	Sensível
A17a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	29	Sensível
A17a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	25	Sensível

A17a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	25	Sensível
A17a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	29	Sensível
A17a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A20a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A20a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A20a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	22	Sensível
A20a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	16	Intermediário
A20a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	23	Sensível
A20a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A20a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	19	Sensível
A20a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente
A22a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	22	Sensível
A22a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	20	Sensível
A22a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	25	Sensível
A22a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A22a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A22a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A22a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	10	Resistente
A22a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	17	Sensível
A24a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A24a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	12	Resistente
A24a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A24a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A24a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	20	Sensível
A24a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A24a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	16	Intermediário
A24a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A25a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	8	Resistente
A25a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	8	Resistente
A25a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A25a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	24	Sensível
A25a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A25a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	14	Intermediário
A25a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	16	Intermediário
A25a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A28a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A28a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	18	Sensível
A28a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	18	Intermediário
A28a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	11	Resistente
A28a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	16	Sensível
A28a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	15	Intermediário
A28a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	12	Resistente
A28a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	8	Resistente

A30a	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A30a	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	14	Resistente
A30a	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A30a	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A30a	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A30a	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	12	Resistente
A30a	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	13	Resistente
A30a	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente

Legenda: primeira sequência da triplicata.

Tabela 6 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para *Listeria* spp..

Amostra 12/06	Antibiótico	Sensível	Resistente	Resultado	Resistência
A04b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A04b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	13	Resistente
A04b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	14	Resistente
A04b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	9	Resistente
A04b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	15	Sensível
A04b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	16	Intermediário
A04b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	16	Intermediário
A04b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A05b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A05b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	9	Resistente
A05b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	23	Sensível
A05b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	11	Resistente
A05b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	23	Sensível
A05b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	20	Sensível
A05b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	16	Intermediário
A05b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	9	Resistente
A06b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente
A06b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	9	Resistente
A06b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	18	Intermediário
A06b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	26	Sensível
A06b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	23	Sensível
A06b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A06b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	19	Sensível
A06b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	16	Sensível
A07b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente
A07b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A07b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A07b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	11	Resistente

A07b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	22	Sensível
A07b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A07b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	10	Resistente
A07b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	12	Resistente
A08b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A08b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	21	Sensível
A08b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	34	Sensível
A08b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	27	Sensível
A08b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	23	Sensível
A08b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	24	Sensível
A08b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	28	Sensível
A08b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	22	Sensível
A09b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	22	Sensível
A09b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	20	Sensível
A09b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A09b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	16	Intermediário
A09b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	17	Sensível
A09b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A09b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	10	Resistente
A09b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	16	Sensível
A11b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	21	Sensível
A11b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	22	Sensível
A11b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	15	Resistente
A11b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A11b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A11b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	14	Intermediário
A11b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	10	Resistente
A11b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A14b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A14b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	8	Resistente
A14b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	27	Sensível
A14b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A14b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	21	Sensível
A14b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	21	Sensível
A14b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	22	Sensível
A14b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	18	Sensível
A16b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A16b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	12	Resistente
A16b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	15	Resistente
A16b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	21	Intermediário
A16b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	19	Sensível
A16b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A16b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	12	Resistente

A16b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente
A17b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	20	Sensível
A17b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	19	Sensível
A17b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	33	Sensível
A17b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	28	Sensível
A17b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	26	Sensível
A17b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	22	Sensível
A17b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	26	Sensível
A17b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A20b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A20b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	11	Resistente
A20b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	26	Sensível
A20b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	17	Intermediário
A20b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	19	Sensível
A20b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	17	Intermediário
A20b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	19	Sensível
A20b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	13	Resistente
A22b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	15	Sensível
A22b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	18	Sensível
A22b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	30	Sensível
A22b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	12	Resistente
A22b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	20	Sensível
A22b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A22b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	24	Sensível
A22b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	18	Sensível
A24b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A24b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	14	Resistente
A24b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	23	Sensível
A24b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	24	Sensível
A24b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	22	Sensível
A24b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	23	Sensível
A24b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	19	Sensível
A24b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	18	Sensível
A25b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A25b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A25b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	23	Sensível
A25b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A25b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A25b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	15	Intermediário
A25b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	17	Intermediário
A25b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	16	Sensível
A28b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	22	Sensível
A28b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	23	Sensível

A28b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	17	Intermediário
A28b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	11	Resistente
A28b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	17	Sensível
A28b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	17	Intermediário
A28b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	12	Resistente
A28b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	13	Resistente
A30b	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente
A30b	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	13	Resistente
A30b	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A30b	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	22	Sensível
A30b	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A30b	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A30b	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	12	Resistente
A30b	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente

Legenda: segunda sequência da triplicata. Fonte: Autor, 2021.

Tabela 7 – Resultados do teste de disco-difusão em ágar das amostras positivas no teste de PCR para *Listeria* spp..

Amostra 12/06	Antibiótico	Sensível	Resistente	Resultado	Resistência
A04c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	13	Intermediário
A04c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	15	Resistente
A04c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	15	Resistente
A04c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	11	Resistente
A04c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	16	Sensível
A04c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A04c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	17	Intermediário
A04c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	12	Resistente
A05c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente
A05c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A05c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	21	Sensível
A05c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	9	Resistente
A05c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A05c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A05c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	18	Intermediário
A05c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	8	Resistente
A06c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A06c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	13	Resistente
A06c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	25	Sensível
A06c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	27	Sensível
A06c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	20	Sensível
A06c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível

A06c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	17	Intermediário
A06c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A07c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A07c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A07c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	20	Sensível
A07c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	8	Resistente
A07c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	18	Sensível
A07c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	14	Intermediário
A07c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	8	Resistente
A07c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A08c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	16	Sensível
A08c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	17	Sensível
A08c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	33	Sensível
A08c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	25	Sensível
A08c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	24	Sensível
A08c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	22	Sensível
A08c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	24	Sensível
A08c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	19	Sensível
A09c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	18	Sensível
A09c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	20	Sensível
A09c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	23	Sensível
A09c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	18	Intermediário
A09c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	16	Sensível
A09c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A09c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	11	Resistente
A09c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A11c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	22	Sensível
A11c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	19	Sensível
A11c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	12	Resistente
A11c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	12	Resistente
A11c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	16	Sensível
A11c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A11c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	11	Resistente
A11c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	9	Resistente
A14c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	7	Resistente
A14c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	12	Resistente
A14c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	17	Intermediário
A14c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível
A14c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	21	Sensível
A14c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A14c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	23	Sensível
A14c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	17	Sensível
A16c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente

A16c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	12	Resistente
A16c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	17	Intermediário
A16c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	20	Intermediário
A16c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	19	Sensível
A16c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A16c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	14	Resistente
A16c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente
A17c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	18	Sensível
A17c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	18	Sensível
A17c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	32	Sensível
A17c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	26	Sensível
A17c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	25	Sensível
A17c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	23	Sensível
A17c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	28	Sensível
A17c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	17	Sensível
A20c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	11	Resistente
A20c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	12	Resistente
A20c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	25	Sensível
A20c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	16	Intermediário
A20c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	24	Sensível
A20c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	18	Sensível
A20c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	20	Sensível
A20c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente
A22c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	16	Sensível
A22c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	20	Sensível
A22c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	31	Sensível
A22c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	8	Resistente
A22c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	27	Sensível
A22c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	25	Sensível
A22c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	28	Sensível
A22c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A24c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	7	Resistente
A24c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A24c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	22	Sensível
A24c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	22	Sensível
A24c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	21	Sensível
A24c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	19	Sensível
A24c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	20	Sensível
A24c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	15	Sensível
A25c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	10	Resistente
A25c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	7	Resistente
A25c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	24	Sensível
A25c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	23	Sensível

A25c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	20	Sensível
A25c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	16	Intermediário
A25c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	16	Intermediário
A25c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	17	Sensível
A28c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	22	Sensível
A28c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	24	Sensível
A28c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	17	Intermediário
A28c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	10	Resistente
A28c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	15	Sensível
A28c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	14	Intermediário
A28c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	9	Resistente
A28c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	10	Resistente
A30c	Amoxicilina – AMO10	≥15	≤12	12	Resistente
A30c	Ampicilina – AMP10	≥16	≤16	10	Resistente
A30c	Ciprofloxacina – CIP05	≥21	≤15	26	Sensível
A30c	Eritromicina – ERI15	≥23	≤13	25	Sensível
A30c	Gentamicina – GEN10	≥15	≤12	22	Sensível
A30c	Kanamicina – KAN30	≥18	≤13	13	Resistente
A30c	Tetraciclina – TET30	≥19	≤14	12	Resistente
A30c	Vancomicina – VAN30	≥15	≤14	14	Resistente

Legenda: terceira sequência da triplicata. Fonte: Autor, 2021.