

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA
Listeria monocytogenes DE ALIMENTOS**

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

ANA BEATRIZ CAROLLO ROCHA LIMA

**SÃO PAULO
2021**

**UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA
Listeria monocytogenes DE ALIMENTOS**

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

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

ANA BEATRIZ CAROLLO ROCHA LIMA

SÃO PAULO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Ana Beatriz Carollo Rocha.

Isolamento e caracterização da *Listeria monocytogenes* de alimentos / Ana Beatriz Carollo Rocha Lima. - 2021.

96 f. : il. color.

Tese de doutorado 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. Doenças transmitidas por alimentos. 3. Sorotipos.
4. Linhagens. I. Rocha, Paulo Ricardo Dell'Armeline (orientador). II. Título.

ANA BEATRIZ CAROLLO ROCHA LIMA

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DA
Listeria monocytogenes DE ALIMENTOS**

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

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

BANCA EXAMINADORA	NOTA	ASSINATURA
Prof.(a) Dr.(a) Selene Dall'Acqua Coutinho - UNIP	9,0	
Prof.(a) Dr.(a) Ivana Barbosa Suffredini - UNIP	9,0	<i>Ivana Barbosa Suffredini</i>
Prof.(a) Dr.(a) Gisele Fabrino Machado - UNESP Araçatuba	9,0	<i>Gisele Fabrino Machado</i>
Prof.(a) Dr.(a) Priscila Reina Siliano da Silva - UFABC	9,0	
Prof.(a) Dr.(a) Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha - UNIP	9,0	<i>Paulo Rocha</i>

Orientador(a)

Média 9,0 / nove

São Paulo, 25 de fevereiro de 2021



Presidente da Banca Examinadora
Dr(a). Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha



DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais por me proporcionarem esta aventura pelo planeta.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e às forças do Universo por me permitirem trilhar o meu caminho.

Agradeço aos meus pais Beatriz Martins Carollo e Diógenes Expedito Rocha Lima pelo privilégio da vida. Agradeço também ao meu tio Ayres Antonio Pereira Carollo e à minha madrinha Rosa Maria Caiafa.

Agradeço ao meu orientador Paulo Ricardo Dell'Armelina Rocha pela amizade e por todo o apoio fornecido para que este projeto fosse viabilizado.

Agradeço a todos os funcionários, em especial, à Sandra Kalil e à Suzana Maria Bezerra, por todo o auxílio prestado. Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço aos membros da banca de qualificação, Prof^a. Dra. Selene Dall'Acqua Coutinho e Prof^a. Dra. Gisele Fabrino Machado, pelas valiosas contribuições. Também agradeço aos meus colegas pelos bons momentos de convivência, em especial, ao Alex de Camargo Coque pelo auxílio na bancada durante os isolamentos e à Edna Cristiane da Matta pelo auxílio na obtenção de amostras do projeto.

Agradeço à UNIP pela bolsa concedida.

Obrigada a todos, de coração.

RESUMO

Listeria monocytogenes é uma bactéria importante para a saúde pública humana e veterinária. As cepas da linhagem I têm sido associadas a grandes surtos de listeriose, e os sorotipos da linhagem II são comuns em alimentos e estão difundidos no ambiente e na produção agrícola; as cepas da linhagem II também são comumente isoladas de casos de listeriose em animais e de casos clínicos humanos esporádicos. Além disso, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 98% dos casos documentados de listeriose humana com alta correlação com o consumo de alimentos contaminados com a bactéria. No Brasil, a prevalência da listeriose não é bem conhecida e não há um sistema de monitoramento nacional, porém estudos indicam uma prevalência em torno de 20% em produtos de origem animal e em sistemas de produção. Este estudo teve o objetivo de caracterizar a bactéria *L. monocytogenes* isolada a partir de alimentos obtidos de estabelecimentos comerciais e feiras livres localizadas em três municípios do Estado de São Paulo, Brasil. Para isso, 130 amostras de alimentos foram inoculadas em meios de cultivo bacteriano cromogênicos e seletivos para o gênero *Listeria*. Além disso, gênero e espécie de *L. monocytogenes*, bem como os sorotipos, foram confirmados por meio de PCR multiplex. O presente estudo identificou uma prevalência de 40% de *L. monocytogenes* em alimentos em feiras e comércios do Estado de São Paulo (queijos, pescados, produtos de origem animal e vegetal e alimentos prontos para consumo). Além disso, das amostras genotipadas por PCR, foi possível identificar via eletroforese que 71 delas pertencem ao gênero *Listeria* sp., e dessas, 52 foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Também foi possível identificar 28 amostras pertencentes ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 14 do sorotipo 1/2b, linhagem II; e 4 do sorotipo 4b, linhagem

I. Os resultados do presente estudo sugerem que cepas patogênicas de *L. monocytogenes* estão circulando em alimentos frescos e/ou prontos para o consumo, o que representa risco de saúde pública. Estudos como o presente, utilizando a biologia molecular, auxiliam a diferenciar cepas avirulentas de virulentas de *L. monocytogenes* em alimentos e fornecem subsídios para o estabelecimento de uma vigilância efetiva sobre a prevalência e incidência da listeriose em alimentos no Estado de São Paulo, bem como no Brasil.

Palavras-chave: Listeriose. Doenças transmitidas por alimentos. Sorotipos. Linhagens.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is an important bacterium for human and veterinary public health. The lineage I strains have been linked to major outbreaks of listeriosis, and serotypes of lineage II are common in food and are widespread in the environment and in agricultural production; lineage II strains are also commonly isolated from cases of listeriosis in animals and sporadic human clinical cases. Moreover, serotypes 1/2a, 1/2b and 4b are responsible for 98% of cases of human listeriosis with a high correlation with the consumption of food contaminated with the bacteria. In Brazil, the prevalence of listeriosis is not well known and there is no national monitoring system, but studies indicate a prevalence around 20% in products of animal origin and production systems. This study aimed to isolate and characterize the bacterium *L. monocytogenes* in foods obtained from commercial establishments and open markets located in three municipalities in the state of São Paulo, Brazil. For this, 130 samples were isolated from selective and chromogenic *Listeria* culture media. In addition, *L. monocytogenes* genus and species, as well as serotypes, were confirmed by multiplex PCR. The present study identified a prevalence of 40% of *L. monocytogenes* in food at fairs and stores in the state of São Paulo (cheeses, fish, animal and vegetable products and ready-to-eat foods). From the PCR genotyped samples, it was possible to identify through electrophoresis that 71 of them belong to the genus *Listeria* sp., 52 of which belonged to the species *Listeria monocytogenes*. It was also possible to identify 28 samples belonging to serotype 1/2b, lineage I; 14 of serotype 1/2a, lineage II; and 4 of serotype 4b, lineage I. The results of the present study suggest that pathogenic strains of *L. monocytogenes* are circulating in fresh and/or ready-to-eat foods, which represents a public health risk. Studies like the present, using molecular biology, help to differentiate avirulent and virulent strains of *L. monocytogenes* in foods and provide subsidies for the establishment of an effective surveillance on the prevalence and incidence of listeriosis in foods in the State of São Paulo, as well as in Brazil.

Keywords: Listeriosis. Foodborne diseases. Serotypes. Strains.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Meio de cultura cromogênico Demi-Fraser	32
Figura 2 – Meio de cultura cromogênico Listeria Oxford	33
Figura 3 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para o total de amostras após eletroforese em gel de agarose	44
Figura 4 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para queijos após eletroforese em gel de agarose	45
Figura 5 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para peixes após eletroforese em gel de agarose	46
Figura 6 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para outros pescados após eletroforese em gel de agarose	47
Figura 7 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para outros produtos de origem animal após eletroforese em gel de agarose	48
Figura 8 – Amostras positivas para <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> para outros produtos de origem vegetal após eletroforese em gel de agarose	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Correspondência entre os principais sorotipos e linhagens genéticas de <i>L. monocytogenes</i>	18
Tabela 2 – Sequências de <i>primers</i> utilizadas	35
Tabela 3 – Amostras isoladas de queijos e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo	37
Tabela 4 – Amostras isoladas de peixes e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo	39
Tabela 5 – Amostras isoladas de outros pescados e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo	41
Tabela 6 – Amostras isoladas de outros produtos de origem animal e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo	42
Tabela 7 – Amostras isoladas de outros produtos de origem vegetal e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APPCC	Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
bp	Pares de bases de DNA
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CCs	Complexos clonais
CEs	Clones epidêmicos
DIPOA/SDA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal/Secretaria de Defesa Agropecuária
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LLS	Listeriolisina S
MLST	<i>Multi Locus Sequence Typing</i>
MvLST	<i>Multi Virulence Locus Sequence Typing</i>
NICD	<i>National Institute for Communicable Diseases</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
PPHO	Procedimentos Padrão de Higiene Operacional
RPLF	<i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
STs	<i>Sequence types</i>
UV	Ultravioleta
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
μM	Micromolar
bp	<i>Base pair</i>
g	Grama
IU	<i>Internacional units</i>
ml	Mililitros
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto
μg	Micrograma
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> – Agente patogênico.....	14
1.2. Sorotipos e linhagens.....	17
1.3. Epidemiologia molecular	19
1.3.1. Clones epidêmicos	19
1.3.2. Complexos clonais.....	20
1.4. Manifestações clínicas	21
1.5. Epidemiologia.....	22
1.5.1. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> no mundo	23
1.5.2. Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> no Brasil	25
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivos Gerais.....	30
3.2. Objetivos Específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Isolamento.....	31
4.2. Extração de DNA.....	33
4.3. Quantificação e diluição de DNA.....	34
4.4. Genotipagem por PCR	34
5. RESULTADOS	36

	xiii
7. DISCUSSÃO	50
8. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I – Artigo de revisão formatado para ser submetido à revista <i>Journal of Veterinary Science (J Vet Sci)</i>	63

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. *Listeria monocytogenes* – Agente patogênico

Listeria é um gênero de bactérias pertencentes ao grupo de bastonetes Gram-positivos, de formato uniforme. São bactérias anaeróbias facultativas, não esporuladas, não formadoras de cápsulas, com flagelos peritríquios. Até o ano de 2017, foram descritas dezessete espécies pertencentes ao gênero *Listeria*¹.

Listeria monocytogenes e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas e de importância na medicina humana e veterinária. *L. ivanovii* foi descrita como patogênica primariamente aos animais, sendo os ruminantes as espécies domésticas mais frequentemente acometidas², principalmente caprinos e ovinos. Porém, um estudo descreveu o primeiro caso de listeriose cerebral em um touro devido à *Listeria innocua*³ e há relatos de *L. ivanovii* associada a bacteremias e gastroenterites em seres humanos, mas com rara ocorrência quando comparado à *L. monocytogenes*⁴.

A espécie *Listeria monocytogenes* possui extremidades arredondadas e tamanho pequeno (0,4 a 0,5 × 0,5 a 2µm)^{2,5}. As células são encontradas isoladas ou em pequenas cadeias, ou podem estar arrançadas em forma de V ou Y ou paliçada (lado a lado). A bactéria apresenta motilidade quando cultivada entre 20°C e 25°C, e apresenta-se imóvel ou com fraca motilidade a 37°C²⁶, oposto ao apresentado por amostras de *L. innocua*⁷. O movimento apresentado por seus flagelos é denominado tombamento, no qual as células iniciam um movimento de torção que aumenta rapidamente e há uma rotação excêntrica antes de se deslocar para várias direções⁸.

A *Listeria monocytogenes* possui capacidade de se adaptar e sobreviver em condições extremas: cresce em ampla faixa de pH (4.3-9.6) e temperatura (0°C a 45°C, com faixa ótima de crescimento entre 30°C a 37°C) e em altas concentrações salinas (10% a >20%)⁹. Este microrganismo suporta repetidos congelamentos e descongelamentos⁸, mas é sensível à pasteurização⁶. Subtipos distintos de *L. monocytogenes* são capazes de sobreviver e se adaptar a vários fatores de estresse, como baixa temperatura, variação de pressão osmótica, baixo pH e concentrações subletais de biocidas¹⁰. Estudos recentes indicam a capacidade de *L. monocytogenes* de formar biofilme¹¹⁻¹³, bem como a susceptibilidade de determinadas cepas aos antimicrobianos ampicilina (2 µg), meropenem (10 µg) e cotrimoxazole (1.25–23.75 µg) e a resistência das mesmas cepas aos antimicrobianos penicilina (1 IU) e

eritromicina (15 µg)¹⁴. Estudos também indicam a presença de genes associados à virulência, ao estresse e à resistência^{15,16}.

Microrganismos se fixam em superfícies e desenvolvem biofilmes. Um biofilme é um conjunto de células microbianas associadas à superfície que está contido em uma matriz de substância polimérica extracelular. Os biofilmes têm grande importância para a saúde pública devido ao seu papel em certas doenças infecciosas¹⁷. Um estudo de 2019 demonstrou que as teteiras de silicone de ordenhadeiras de vacas contaminadas com *L. monocytogenes* podem contribuir para a transmissão no rebanho e identificou que cepas isoladas do leite formaram um biofilme significativamente mais forte, enquanto cepas com mais genes de virulência foram resistentes a um maior número de antibióticos e também formaram um biofilme mais forte. Os resultados deste estudo evidenciam a necessidade de se monitorar a ocorrência de biofilmes de *L. monocytogenes* em ambientes de processamento de laticínios¹⁸.

Um estudo realizado para investigar o papel dos ruminantes na epidemiologia da listeriose no norte da Itália e a possível associação de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos de rombencefalite em ruminantes com cepas associadas à doença humana sugere que os ruminantes representam um reservatório natural importante de *L. monocytogenes* e uma fonte potencial de cepas patogênicas para seres humanos¹⁹. A listeriose em animais também pode representar um risco potencial para a segurança alimentar e saúde pública devido à relação entre o ambiente rural e a infecção humana²⁰.

A ligação entre ruminantes e listeriose humana não é completamente compreendida²⁰, mas pesquisas indicam ruminantes como possíveis reservatórios para infecção humana^{19,21}, reforçando a relação entre o ambiente rural, os sistemas de produção e os casos de listeriose humana. A possibilidade da silagem como reservatório de cepas epidêmicas humanas ou adaptadas a animais de *L. monocytogenes* deve ser investigada, bem como a prevalência de clones patogênicos em ruminantes²⁰.

A adaptação de clones a nichos ecológicos distintos e/ou a diferentes rotas de contaminação de produtos alimentícios devem ser os principais fatores responsáveis pela distribuição global do patógeno. O potencial de virulência dos clones pode estar intrinsecamente relacionado ao seu potencial de adaptação, já que clones hipervirulentos colonizam melhor o lúmen intestinal e invadem mais tecidos intestinais

do que os clones hipovirulentos, enquanto clones hipovirulentos são adaptados aos ambientes de processamento de alimentos e possuem maior prevalência de genes de resistência ao estresse e tolerância a desinfetantes, bem como uma maior capacidade de sobrevivência e formação de biofilme na presença de concentrações subletais de desinfetantes, como o cloreto de benzalcônio. Dessa forma, a heterogeneidade da virulência reflete a diversidade dos nichos ecológicos nos quais o patógeno prevalece^{16,22}.

É possível distinguir três padrões distintos entre os principais clones de *L. monocytogenes*: (i) isolados de pacientes clínicos, altamente prevalentes em produtos lácteos e com baixa adaptação aos ambientes de processamento de alimentos (linhagem I); (ii) isolados associados a alimentos, com baixa adaptação ao hospedeiro e alta adaptação aos ambientes de processamento de alimentos devido à formação de biofilme e tolerância aos desinfetantes (linhagem II); e (iii) isolados intermediários, que podem estar em processo de transição do estilo de vida associado ao hospedeiro para o estilo saprófito^{16,23}. Embora os clones hipervirulentos tenham sido identificados primariamente na linhagem I, dados recentes demonstram que os clones hipervirulentos podem também estar presentes na linhagem II²².

A *Listeria monocytogenes* está amplamente distribuída na natureza e pode ser isolada da água, do solo, do esgoto, da vegetação (pasto, silagem), de hortaliças, de fezes de animais, de instalações de processamento de alimentos e em diferentes alimentos como leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves, de peixes, embutidos, produtos de origem vegetal, de origem marinha e alimentos prontos para consumo^{8,24}. A bactéria também pode ser encontrada no trato gastrointestinal do homem saudável, o que pode levar à contaminação de água e alimentos, bem como infecção dos animais, sendo muito comum a contaminação da carcaça e cortes de carne durante o abate em frigoríficos, assim como durante o processamento inadequado dos alimentos²⁵⁻²⁸. Estudos sugerem que 1-10% dos seres humanos podem ser portadores de bactérias do gênero *Listeria*. Portanto, portadores assintomáticos, animais infectados e fontes ambientais podem levar a contaminação de água e de alimentos e à consequente infecção de animais de produção.

Determinadas cepas têm sido frequentemente isoladas de alimentos de origem animal, indicando possivelmente que os animais de criação e o ambiente relacionado a este possam servir como reservatório, incluindo a água, ração contaminada, silagem

de baixa qualidade e contaminação cruzada na produção de alimentos prontos para consumo^{19,29}.

Para a indústria de alimentos, na qual a presença de *L. monocytogenes* é uma grande preocupação, rastrear cepas contaminantes dentro da cadeia alimentar e do ambiente da planta é de primordial importância⁹. O Brasil é um dos principais países produtores de alimentos no mundo; portanto, estudos de identificação de *Listeria monocytogenes* em alimentos são de extrema relevância para se conhecer a epidemiologia global do patógeno. No Brasil há poucos casos relatados de listeriose, porém o patógeno tem sido frequentemente isolado de laticínios e ambientes de processamento de alimentos. Embora a ocorrência e a prevalência da listeriose não sejam bem conhecidas e não haja um sistema de monitoramento nacional, estudos indicam uma alta prevalência de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal e em sistemas de produção.

1.2. Sorotipos e linhagens

São conhecidos até o momento 15 sorotipos da *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b e 7. Os antígenos O e H são utilizados para detecção sorológica com anticorpos correspondentes. Os sorotipos de cepas de *Listeria* individuais podem ser determinados por combinações únicas de seus 15 antígenos somáticos O (nomeadamente I-XV) e 4 antígenos flagelares H (nomeadamente A-D)³⁰.

Os sorotipos 4b, 1/2b e 1/2a são os mais frequentemente associados (90%) a infecções humanas^{31,32}, sendo que o sorotipo 4b foi identificado em 50% destas³³. Os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 98% dos casos documentados de listeriose humana e isolados derivados de origem ambiental e de alimentos, enquanto os sorotipos 4a e 4c são raramente associados a surtos da doença. Amostras do sorotipo 4b são as mais associadas aos surtos da doença, enquanto os sorotipos 1/2a e 1/2b tem sido associados a infecções esporádicas por *L. monocytogenes*³⁰.

De acordo com as características obtidas pela ribotipagem e por *restriction fragment length polymorphism* (RPFL) dos genes de virulência de *L. monocytogenes* (*hly*, *inlA* e *actA*), combinados com a origem dos isolados e seus sorotipos, Wiedmann e colaboradores (1997)³⁴ agruparam *L. monocytogenes* em 3 linhagens genéticas: linhagem I (que inclui os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e); linhagem II (inclui os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c); e linhagem III (sorotipos 4a e 4c). Uma quarta linhagem

filogenética foi descrita, linhagem IV, que representa um grupo distinto com diferenças filogenéticas de outras linhagens, sendo pouco encontrada, compreende os sorotipos 4a, 4c e 4b atípicos^{29,30}. A maioria dos isolados de *L. monocytogenes* pertence às linhagens I e II, que abrigam os sorotipos mais comumente associados a casos clínicos humanos, incluindo o sorotipo 1/2a (linhagem II) e os sorotipos 1/2b e 4b (linhagem I). A maioria dos surtos de listeriose humana está associada a isolados de linhagem I. Os sorotipos da linhagem II são comuns em alimentos e estão difundidos nos ambientes naturais e agrícolas; também são comumente isolados de casos de listeriose em animais e casos clínicos humanos esporádicos³⁵. Muito menos se sabe sobre a linhagem III e a linhagem IV devido ao menor número de cepas isoladas e caracterizadas. As cepas da linhagem III são comuns em isolados de animais e menos frequentemente encontradas em produtos alimentícios, talvez devido à sua capacidade reduzida de se replicar em temperaturas refrigeradas. O potencial de virulência dos isolados da linhagem III ainda não está claro, com alguns relatos descrevendo cepas sendo isoladas de animais e seres humanos com doença clínica e neuroinvasiva³⁶.

Historicamente, a linhagem I agrupa as cepas envolvidas nos principais surtos de listeriose³⁷. Dentre os requisitos de virulência da linhagem I, destaca-se o agrupamento de genes listeriolisina S (LLS), que exibe atividade bactericida e modifica a microbiota do hospedeiro durante a infecção [92], as ilhas de patogenicidade LIPI-III (presente em CC1 a CC6) e a LIPI-IV (limitado a CC4 e ST87), que contribuem para a invasão neural e placentária^{15,38}. A Tabela 1 demonstra a correspondência entre os principais sorotipos e linhagens genéticas de *L. monocytogenes*.

Tabela 1 – Correspondência entre os principais sorotipos e linhagens genéticas de *L. monocytogenes*^{29,30}

Sorotipos	Linhagens genéticas
1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e	Linhagem I
1/2a, 1/2c, 3a e 3c	Linhagem II
4a e 4c	Linhagem III
4a, 4b e 4c atípicos	Linhagem IV

Para identificação dos sorotipos e linhagens de acordo com a metodologia de Doumith e colaboradores (2004), são utilizados os genes marcadores *Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819*, *ORF2110* e *prs*. Os genes *Imo0737* e *Imo1118* são genes do metabolismo de *Listeria monocytogenes* de função desconhecida. Já o gene

ORF2819 codifica um regulador transcricional putativo, o gene *ORF2110* codifica uma proteína secretada putativa e o gene *prs* codifica o fosforibosil pirofosfato sintetase putativa⁹.

1.3. Epidemiologia molecular

A epidemiologia molecular é a utilização da biologia molecular como ferramenta para estudar a distribuição e determinantes de doenças infecciosas³⁹. Por meio de técnicas de biologia molecular, vários surtos de listeriose foram investigados e constatou-se a relação destes surtos com clones epidêmicos (CEs) ou complexos clonais (CCs)^{29,39-44}.

1.3.1. Clones epidêmicos

A combinação de métodos de subtipagem fenotípica e genotípica das amostras isoladas tem-se demonstrado altamente eficaz na investigação de surtos da listeriose³⁹. Estudos têm demonstrado que, em geral, estes surtos de listeriose são causados por um pequeno número de cepas estreitamente relacionadas geneticamente, sugerindo pertencer a um grupo de clones bem definidos, implicados em epidemias diferentes, geograficamente e temporariamente não relacionadas, os CEs^{39,45}.

Os CEs são definidos pelo método de referência *Multi Virulence Locus Sequence Typing* (MvLST), que avalia sequências de *primers* para pesquisa de genes de virulência bacterianos, analisando seis a oito genes associados à virulência⁴⁰. Os principais CEs são ECI, ECII, ECIII e ECIV, ECVI e ECVII^{29,39}.

Os maiores surtos de listeriose humana fatal em todo mundo têm sido relacionados aos CEs³⁹. Há a hipótese de que amostras de CE foram associadas a vários surtos de listeriose humana, possivelmente devido a uma melhor aptidão para persistir ao ambiente, sobreviver e multiplicar em alimentos, e não necessariamente porque são mais virulentas²⁹. O envolvimento do mesmo CE em múltiplos surtos sugere que tais amostras possuem um reservatório. Por exemplo, o ECI tem sido frequentemente encontrado em alimentos de origem animal, indicando possivelmente que os animais de criação e o ambiente em que vivem possam servir como reservatório, incluindo ração contaminada, silagem de baixa qualidade e contaminação cruzada na produção de alimentos prontos para consumo²⁹.

Com relação ao sorotipo 4b, são atualmente reconhecidos os CEs ECI, ECII, e ECIV; já sobre o sorotipo 1/2a, foram descritos e caracterizados os CEs ECIII, ECV e ECVII; e no sorotipo 1/2b o ECVI²⁹.

1.3.2. Complexos clonais

Os CCs são definidos pelo método de referência *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) que avalia sequências de *primers* para pesquisa de genes do metabolismo bacteriano. Este método fornece uma nomenclatura padronizada, baseada na sequência de nucleotídeos de sete genes *housekeeping*, com classificação das cepas por (i) *sequence types* (STs), definidos como a associação única de alelos dos sete genes *housekeeping*, e por (ii) CCs, definidos como um *cluster* de STs compartilhando pelo menos seis alelos^{43,46}.

O método é utilizado para caracterização de *L. monocytogenes* por meio de sequências de *primers* para pesquisa de genes do metabolismo bacteriano através do sequenciamento de fragmentos de genes *housekeeping* da bactéria, sendo altamente discriminatório. Uma grande vantagem deste método é a sua capacidade de detectar mudanças do DNA, que não são evidentes por abordagens fenotípicas, como a genotipagem. Além disso, é uma técnica que pode ser prontamente reproduzida e não requer acesso a reagentes ou treinamentos especializados⁴³.

Os dados gerados podem ser compartilhados entre laboratórios pela internet⁴⁷. Os métodos modernos de sequenciamento direto de nucleotídeos com base na reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), como o MLST, não requerem acesso direto a isolados bacterianos vivos ou DNA genômico de alta qualidade. As técnicas podem ser realizadas em suspensões celulares mortas, evitando todas as dificuldades associadas ao transporte e manipulação de agentes patogênicos, ou em amostras clínicas, como o líquido cefalorraquidiano ou o sangue de um paciente submetido à terapia antibiótica, a partir do qual pode ser difícil de obter um isolado bacteriano vivo⁴⁷.

O método genotípico MLST pode ser usado para identificar os principais clados filogenéticos, grupos moleculares ou subpopulações de uma espécie, bem como cepas, clones individuais ou complexos clonais (CCs). É uma ferramenta para análise epidemiológica e de vigilância de patógenos, bem como para investigar sua estrutura e evolução⁴⁸.

Os CCs mais prevalentes correspondem a CEs associados a surtos importantes: CC1 e ECI, CC2 e ECIV, CC5 e ECVI, CC6 e ECII, CC7 e ECVII, CC8 e ECV com pré-requisitos completos de virulência (por exemplo, prfA, internalin A e B; listeriolisina O e actA)¹⁵. No entanto, a diversidade e os perfis de virulência dos isolados de *L. monocytogenes* ainda não foram totalmente descritos⁴³.

Em particular, CC1, CC2, CC6 e CC101 têm sido associados a casuísticas clínicas em seres humanos^{49,50}. O CC4 é um complexo clonal geralmente prevalente em casos de listeriose humana e é considerado neuroinvasivo e hipervirulento⁵⁰. Outros CCs, como CC9 e CC121, estão associados a alimentos e são mais frequentemente isolados em pacientes altamente imunocomprometidos⁴⁹. Estudos realizados com isolados de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo na União Europeia revelaram que os CCs CC121, CC8 e CC155 foram predominantemente isolados de peixes e produtos de pescados, enquanto as linhagens CC31 e CC2 apresentaram maior frequência em carnes e derivados^{51,52}.

1.4. Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da listeriose incluem infecções do sistema nervoso central (meningite e meningoencefalite), septicemia, endocardite, infecção gastrointestinal (febre, vômito, náusea, diarreia), infecções localizadas e abortamento^{2,53}. A listeriose pode causar infecção na gestação, infecção neonatal, bacteremia, meningite, endocardite, abscessos cerebrais e infecções localizadas devido à bacteremia, como por exemplo peritonite e infecções nas articulações⁵. A *Listeria monocytogenes* é causa comum de meningite bacteriana, juntamente com *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* do grupo B e *Staphylococcus aureus*⁵⁴. Além disso, infecções perinatais por *Listeria* podem causar abortamento, morte fetal e uma doença séptica devastadora denominada "granulomatose infantisepticum"^{55,56}.

Acredita-se que a *Listeria monocytogenes* colonize o encéfalo por invasão direta da barreira hematoencefálica, por transporte a partir da barreira por monócitos infectados e/ou por migração axonal para o tronco cerebral. As duas primeiras vias têm sido associadas ao imunocomprometimento³⁶. A listeriose compromete o fígado, o baço, o líquido e o sangue. Em adultos considerados saudáveis, causa febre e diarreia, mas pode ocorrer meningite e bacteremia; em mulheres grávidas causa febre, diarreia, abortamento ou natimortos, neonatos apresentam pneumonia, sepsis ou

meningite. Além disso, indivíduos imunodeprimidos (câncer, transplantados, doenças hepáticas, AIDS/HIV e diabetes) podem desenvolver meningite, sepse, e infecção do sistema nervoso. A forma não invasiva da doença, denominada gastroenterite febril ou gastroenterite não invasiva, tem sido relacionada a surtos associados a ingestão de queijos, carne congelada, achocolatado, peixe defumado, milho e salada de arroz contaminados⁵⁷.

A *Listeria monocytogenes* pode acometer várias espécies animais, como mamíferos, principalmente os ruminantes, gerando um impacto econômico prejudicial para a produção, além da espécie se tornar uma fonte de infecção para o homem, principalmente pelo consumo de produtos de origem animal contaminados^{14,19,58,59}. Adicionalmente, as aves são portadoras subclínicas do microrganismo, além de peixes e crustáceos⁶⁰. A silagem contaminada é uma fonte clássica de infecção por *L. monocytogenes* para animais, que podem adoecer (doença da silagem) ou se tornarem portadores assintomáticos, eliminando a bactéria nas fezes e no leite⁶.

Conforme a espécie animal, a listeriose apresenta-se clinicamente das seguintes formas: em ruminantes, há um quadro de meningoencefalite (andar em círculo, anorexia, pressionamento da cabeça ou tombar a cabeça para um lado, ceratoconjuntivite bilateral, paralisia do nervo trigêmeo e facial unilateral; o quadro clínico é de subagudo a crônico; em ovelhas e cabras o quadro é agudo e geralmente fatal); abortamento (após 7 meses em gado e 12 semanas em ovelhas); conjuntivite; mastite aguda ou crônica. Além disso, em seres humanos neonatos e outros mamíferos monogástricos pode ocorrer um quadro de septicemia. Os animais apresentam depressão, inapetência, febre e morte. Em equinos, a forma mais comum de apresentação da doença é a septicemia em neonatos²⁴.

1.5. Epidemiologia

Epidemias de listeriose em seres humanos têm sido relacionadas a alimentos de origem animal contaminados, como leite, leite pasteurizado, queijos e seus derivados, salsicha, produtos defumados, patê de fígado, carne, vegetais crus não lavados e repolho contaminado⁵, produtos industrializados e prontos para consumo⁶¹.

A análise de dados de vigilância de longo prazo em diversos países tem mostrado que os produtos alimentícios crus e processados podem ser contaminados por *L. monocytogenes* em diferentes estágios de produção^{25,26,28}, e que algumas categorias de alimentos como laticínios, produtos cárneos e produtos prontos para

consumo são mais frequentemente contaminadas¹⁶. É importante enfatizar que vários surtos têm sido historicamente associados ao consumo de leite cru fresco e queijo não pasteurizado, demonstrando que o papel de boas medidas de higiene na fazenda pode reduzir a probabilidade de contaminação do leite⁶².

A maior prevalência de infecção por listeriose de origem alimentar está relacionada às classes socioeconômicas de maior poder aquisitivo, devido ao consumo de alimentos industrializados, e a maioria dos surtos de listeriose tem ocorrido na Europa, EUA e Canadá, ou seja, em clima temperado, e em menor frequência na Austrália e Nova Zelândia⁵⁷.

1.5.1. Ocorrência de *L. monocytogenes* no mundo

O primeiro diagnóstico de listeriose em seres humanos foi feito em um soldado com meningite no final da 1ª Guerra Mundial⁷. Já o primeiro surto confirmando uma transmissão indireta de animais para seres humanos foi relatado apenas em 1983, nas províncias marítimas do Canadá. Nesse surto, as couves, armazenadas no frio durante o inverno, foram contaminadas com *L. monocytogenes* pela exposição ao estrume de ovelha infectada. Um surto subsequente na Califórnia, em 1985, confirmou o papel dos alimentos na disseminação da listeriose. Desde então, a *L. monocytogenes* tem sido implicada em muitos surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), mais comumente decorrentes da exposição a produtos lácteos contaminados e a produtos preparados à base de carne, incluindo peru e charcutaria, patê, cachorros-quentes, frutos-do-mar e peixes⁶³. No final da década de 80, pesquisadores, principalmente da Europa Central, começaram a estudar a listeriose como doença de origem alimentar²⁶.

Na América do Norte e Europa, durante a década de 1980, ocorreram diversos surtos de listeriose humana. Em 1985, houve um surto devido ao consumo de queijo *Mexican-style*, na Califórnia, determinante para tornar *L. monocytogenes* um patógeno de alta prioridade para DTAs⁶⁴ e, desde então, vários surtos de listeriose relacionados a laticínios foram relatados em todo mundo⁶⁵. Um estudo recente com amostras de queijo Brie, Camembert, Gorgonzola, Munster e Roquefort obteve 15 isolados de *L. monocytogenes* a partir de 250 amostras (6%)¹⁴. Uma análise genômica de 121 isolados de *L. monocytogenes* recuperados de leite, filtros de leite e equipamento de ordenha coletados de fazendas de gado leiteiro bovino em 19 estados dos EUA durante um período de 12 anos revelou vários CCs previamente associados a

infecções do sistema nervoso central e infecções materno-neonatais. Além disso, algumas cepas foram similares àquelas que foram isoladas de surtos anteriores não relacionados com produtos lácteos⁴³.

Em 2007, foram relatados 1.558 casos de listeriose em 27 países da Europa, com índice de letalidade geral de 20% e de letalidade em idosos de 67%^{58,66}. Nos EUA, em 2010, ocorreram 1.662 casos de listeriose, com índice de hospitalização de 91% e taxa de letalidade de 16%⁶⁶. Um sequenciamento completo do genoma (WGS) de 25 isolados de *L. monocytogenes* de casos de infecção clínica na Irlanda, entre 2013 e 2015, determinou que 64% dos pulsotipos clínicos foram previamente encontrados em alimentos ou no ambiente de processamento de alimentos⁵⁰, reforçando a relação entre os casos de infecção clínica e os alimentos contaminados.

O maior surto de listeriose descrito até hoje da história ocorreu na África do Sul. No período de janeiro de 2017 até abril de 2018, 1011 casos confirmados em laboratório foram reportados ao *National Institute for Communicable Diseases* (NICD), sendo 41% neonatos com menos de 28 dias de vida. Até o momento, os resultados das análises estão disponíveis para 691 casos (68%), dos quais 193 morreram (taxa de letalidade de 28%). A causa do surto foi identificada como produtos de carne processados prontos para consumo, fabricados em uma unidade de produção. O sequenciamento do genoma de 442 amostras identificou 92% destas como “*Sequence type*” 6 (ST6)⁶⁷. Em dezembro de 2017, o Departamento de Saúde da África do Sul incluiu pela primeira vez a listeriose na lista de doenças notificáveis na África do Sul.

Diversos estudos também realizaram o isolamento de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios e ambientes de processamento de alimentos. Um estudo realizado na Áustria acompanhou a evolução interna de genótipos de *L. monocytogenes* coletados de um ambiente de processamento de alimentos fortemente contaminado e detectou no início da amostragem uma grande variedade de STs, predominando ST1 (sorotipo 4b, linhagem I), ST21 (sorotipo 1/2a, linhagem I) e ST87 (sorotipo 1/2b, linhagem II), que não apresentavam plasmídeos. Após intensificação das medidas de higiene, a variabilidade foi reduzida quase que inteiramente para *L. monocytogenes* ST5 (sorotipo 1/2b, linhagem II), que predominou nos dois anos seguintes e cujos plasmídeos abrigavam um sistema de resistência a metais pesados, possivelmente fornecendo uma maior tolerância aos desinfetantes¹⁵.

Um estudo realizado de 2011 a 2016 em 43 cidades da China isolou 846 amostras de produtos aquáticos (moluscos, crustáceos e peixes) obtidos de

estabelecimentos comerciais diversos, identificou-se que 67 delas (7,92%) foram positivas para *L. monocytogenes*⁶⁸. Um outro estudo na China avaliou a ocorrência geral de *L. monocytogenes* em produtos cozidos, e obteve um percentual positivo de 16,2% em lojas prontas para consumo e restaurantes de carne de carneiro, 13,5% na carne de porco, 6,5% em vegetais, e mais de 24% em *haggis* cozidos ou cozidos de carneiro. Os sorotipos 1/2b (45,4%), 1/2a (33,3%) e 1/2c (14,2%) foram predominantes. Adicionalmente, a comparação dos complexos clonais (CCs) baseados na tipagem de sequência MLST de *L. monocytogenes* de alimentos cozidos na cidade de Zigong e 33 casos de listeriose de diferentes distritos da China revelou que o CC87, CC9, CC8 e CC3 foram os mais prevalentes em produtos cozidos, e CC87 e CC3 foram os dois tipos frequentes nas 33 cepas de origem clínica⁴⁴.

Na Polônia, entre 2014 e 2016, foram estudadas 301 amostras de peixes frescos e defumados para pesquisa de *L. monocytogenes*. 18% (57) das amostras estavam contaminadas pela bactéria. Dentre os quatro sorotipos identificados, o prevalente foi o sorotipo 1/2a-3a (70,2%), seguido do sorotipo 1/2b-3b-7 (24,6%). A alta prevalência de *L. monocytogenes* identificada neste estudo ressalta a importância de peixes frescos e defumados como potenciais veículos para transmissão deste microrganismo e consequente preocupação para a saúde pública⁴².

Na Pensilvânia (EUA), um estudo em uma instalação comercial de corte e empacotamento de cogumelos foi conduzido para determinar a prevalência, distribuição e potenciais rotas de transmissão de *L. monocytogenes*. A bactéria estava presente em 18,8% das amostras. O MVLST identificou 4 diferentes tipos de virulência (VTs) de *L. monocytogenes* na instalação: VT11, VT107, VT105 e VT56. Um dreno e um piso de concreto poroso foram identificados como locais de abrigo para *L. monocytogenes*. Melhorias nas práticas de saneamento e manutenção das instalações diminuíram a sua prevalência, no entanto, a eliminação completa do patógeno não foi alcançada⁶⁹.

1.5.2. Ocorrência de *L. monocytogenes* no Brasil

No Brasil, a ocorrência, bem como a prevalência da listeriose não são bem conhecidas, e não há um sistema de monitoramento nacional, porém alguns estudos indicam uma alta prevalência em produtos de origem animal e nos sistemas de produção^{41,70-73}. Estes dados contribuem para a subnotificação do patógeno no país.

O governo brasileiro possui uma normativa específica para reduzir o risco de surtos de listeriose em alimentos: a Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que institui os procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal. Com o objetivo de monitorar e assegurar a inocuidade destes produtos em relação a este patógeno, os estabelecimentos que fabricam produtos de origem animal prontos para o consumo devem estabelecer procedimentos de autocontrole, o que envolve Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) e o Programa de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Os produtos de origem animal em que houver a constatação de *L. monocytogenes* são apreendidos e poderão ser reprocessados e comercializados, desde que o procedimento aplicado assegure a destruição do microrganismo⁷⁴. Em 2013, houve atualização dessa mesma normativa com a Norma Interna DIPOA/SDA nº 1, de 9 de agosto de 2013, a qual aprova os procedimentos operacionais complementares⁷⁵, porém não esclarece quais metodologias laboratoriais seriam recomendadas para caracterizar as cepas isoladas de *L. monocytogenes*, diferenciando cepas patogênicas das cepas comensais ou não patogênicas. Assim, as normativas até hoje divulgadas pelo Ministério da Agricultura não estão de acordo com os padrões internacionais, o que caracteriza, na prática, uma subnotificação dos casos de listeriose no Brasil, evidenciando a necessidade de vigilância epidemiológica ativa e passiva contínua desse patógeno na representativa indústria de laticínios do Brasil⁴¹.

Em 2001, na cidade de Pelotas (RS), foram analisadas amostras de matéria-prima utilizada no preparo da linguiça, os equipamentos da linha de processamento e o produto oriundo de frigoríficos, e *L. monocytogenes* foi isolada em 29,3% das amostras. A identificação bacteriana foi realizada por testes fenotípico e bioquímico (catalase, motilidade, β -hemólise e fermentação de dextrose, manitol, xilose e ramnose). Este resultado demonstrou a necessidade de readequação nas práticas sanitárias das plantas de processamento analisadas, bem como um risco potencial de listeriose ao consumidor⁷³.

No Distrito Federal, foi identificada a presença de *L. monocytogenes* em cortes cárneos bovinos e no ambiente de abatedouros frigoríficos, em amostras colhidas no período de 2014 a 2015. Os métodos utilizados para identificação de *L. monocytogenes* foram: genotipagem por PCR, teste de resistência aos

antimicrobianos, eletroforese de campo pulsante (PFGE). Os principais sorotipos encontrados foram o 4b, 1/2a e 1/2c⁷¹.

Estudos brasileiros têm demonstrado que o isolamento de *L. monocytogenes* em laticínios varia entre 0 a 41,4%⁴¹. O queijo é o produto que mais tem apresentado contaminação por *L. monocytogenes*⁴¹, principalmente os queijos de média e de alta umidade. São produtos armazenados por longos períodos sob refrigeração, permitindo o crescimento da bactéria *L. monocytogenes*, além do fato de serem consumidos sem aquecimento prévio⁶. O queijo é o produto derivado do leite mais consumido no Brasil, principalmente o queijo minas frescal⁷⁶.

Um estudo realizado no Brasil sobre a ocorrência de espécies de *Listeria* e *L. monocytogenes* em diferentes tipos de produtos alimentícios, como leite, queijo, carne processada e não processada, alimentos prontos para consumo e vegetais, no período entre 1990 e 2012, mostrou que *L. monocytogenes* foi predominantemente isolada (38,9%) no período entre 2001 e 2012. Com relação à distribuição geográfica, dentre os 12 estados avaliados, os estados da Paraíba, Mato Grosso, São Paulo e Rio Grande do Sul tiveram a maior prevalência de *L. monocytogenes* (71,7%). Os sorotipos 1/2a e 4b foram mais comuns em carne processada e em produtos prontos para consumo, respectivamente, e os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b foram os mais comuns na carne não processada. Para a identificação foram realizados os testes de hemolisina, motilidade, coloração de Gram, testes bioquímicos (xilose, manitol, ramnose), CAMP teste e genotipagem com antissoro policlonal. Os resultados confirmaram a presença dos principais sorotipos de *L. monocytogenes* em diferentes partes da cadeia alimentar de três regiões do país e enfatizaram a importância de melhorar as medidas de controle no Brasil⁷⁰.

Um estudo recente determinou o perfil MLST de 86 isolados de *L. monocytogenes* da indústria de laticínios brasileira⁴¹ isolados em um estudo anterior⁶ utilizando a técnica de PCR e verificou que estes pertenciam às linhagens I e II, sorotipos 4b, 1/2b e 1/2c. Dos nove isolados de *L. monocytogenes*, uma sequência ST2 pertencia ao sorotipo 4b e a linhagem I, que é a responsável pela maioria dos surtos de listeriose no mundo. Das 437 amostras, três amostras (0,7%) do varejo e apenas uma amostra (0,2%) de laticínios foram positivos para *L. monocytogenes*. Além disso, sequências ST3 e ST8 foram encontradas no queijo comercializado e também foram associadas anteriormente a surtos⁴¹.

Outro estudo forneceu uma caracterização bacteriológica e molecular de 100 amostras de *L. monocytogenes* isoladas de seres humanos (43) e alimentícios (57), provenientes de várias regiões do Brasil, colhidas entre 1975 e 2013. A caracterização antigênica definiu 49% como sendo do sorotipo 4b, 28% do sorotipo 1/2b, 14% do sorotipo 1/2c, 8% do sorotipo 1/2a e 1% do sorotipo 3b, reforçando a prevalência do sorotipo 4b no país⁷².

Em um estudo de 2007, foram analisadas 255 amostras de *Listeria* colhidas entre 1969 e 2000, isoladas de diferentes materiais clínicos, tanto de indivíduos doentes como de aparentemente normais, no caso, foi possível caracterizar a distribuição de sorotipos de *L. monocytogenes*. O estudo detectou por meio de técnicas bioquímicas sete sorotipos de *L. monocytogenes*, sendo que o sorotipo 4b foi o mais incidente (60,3%), seguido por 1/2a (29%), ocorrendo em quase todas as regiões do país, evidenciando a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana no Brasil⁷⁷.

Portanto, devido aos poucos registros existentes, de maneira geral, ainda carecem estudos sobre a caracterização sobre a *L. monocytogenes* no Brasil com padrões e metodologias internacionais, a fim de combater a subnotificação existente no território nacional.

2. JUSTIFICATIVA

A listeriose é uma zoonose de grande importância em saúde pública^{2,26}. O portador pode ser fonte de contaminação ambiental⁷⁷ e, assim, fonte indireta para a infecção. A infecção de origem alimentar por listeriose está relacionada à resistência à temperatura de refrigeração, ingestão de alimentos contaminados (manipulação inadequada, contaminação cruzada) ou malcozidos²⁶.

A investigação de *L. monocytogenes* é necessária e fundamental para estabelecer a relação entre o tipo de alimento consumido e a ocorrência da bactéria em amostras clínicas, além de possibilitar que a determinação da importância deste como agente infeccioso, o controle e prevenção de surtos de listeriose de origem alimentar na população³⁷. A presença de *L. monocytogenes* em equipamentos e utensílios nas plantas de processamento de produtos de origem animal pode representar um sério risco à população, devido à possibilidade de incorporação da bactéria ao produto final (contaminação cruzada)⁷⁸.

Há poucos registros de casos de listeriose humana no Brasil, pois a doença é subnotificada e subdiagnosticada^{6,79,80}. É provável que, na maioria dos casos humanos esporádicos, o alimento seja o veículo de transmissão de *L. monocytogenes*, o que reforça a necessidade de identificar os possíveis alimentos envolvidos, principalmente leite e derivados⁶. A combinação de métodos genotípicos e fenotípicos tem-se demonstrado altamente eficaz na investigação de surtos da doença³⁹.

A investigação da epidemiologia e dos fatores de virulência de *L. monocytogenes* por meio de métodos moleculares são essenciais, pois auxiliarão na elucidação da ecologia, evolução e caracterização das linhagens deste microrganismo, trazendo, assim, melhores estratégias de controle e prevenção de listeriose de origem alimentar²⁹. Para caracterização genética da bactéria, faz-se necessária a utilização de técnicas para diferenciar as cepas e identificar CCs e CEs³⁹.

No Brasil a identificação de cepas patogênicas de *L. monocytogenes* é um desafio. Pode-se observar que nos artigos publicados, em geral, as pesquisas realizadas no Brasil utilizam metodologia restrita às técnicas de provas bioquímicas, testes sorológicos e, em pequena frequência, PCR, o que configura uma caracterização genética parcial de *L. monocytogenes* no país.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Investigação e caracterização da bactéria *L. monocytogenes* em amostras de alimentos (queijos, pescados, produtos de origem animal e vegetal e alimentos prontos para consumo) de estabelecimentos comerciais e feiras de grandes cidades do Estado de São Paulo (São Paulo, Jundiaí e Santos).

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Verificar a existência de bactérias do gênero *Listeria* e *L. monocytogenes* em alimentos (queijos, pescados, produtos de origem animal e vegetal e alimentos prontos para consumo) de estabelecimentos comerciais e feiras de grandes cidades do Estado de São Paulo (São Paulo, Jundiaí e Santos);
- 3.2.2. Realizar a confirmação da espécie *L. monocytogenes* isolada nestas amostras por meio de PCR;
- 3.2.3. Identificar os principais sorotipos de *L. monocytogenes* utilizando-se da genotipagem por meio de PCR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

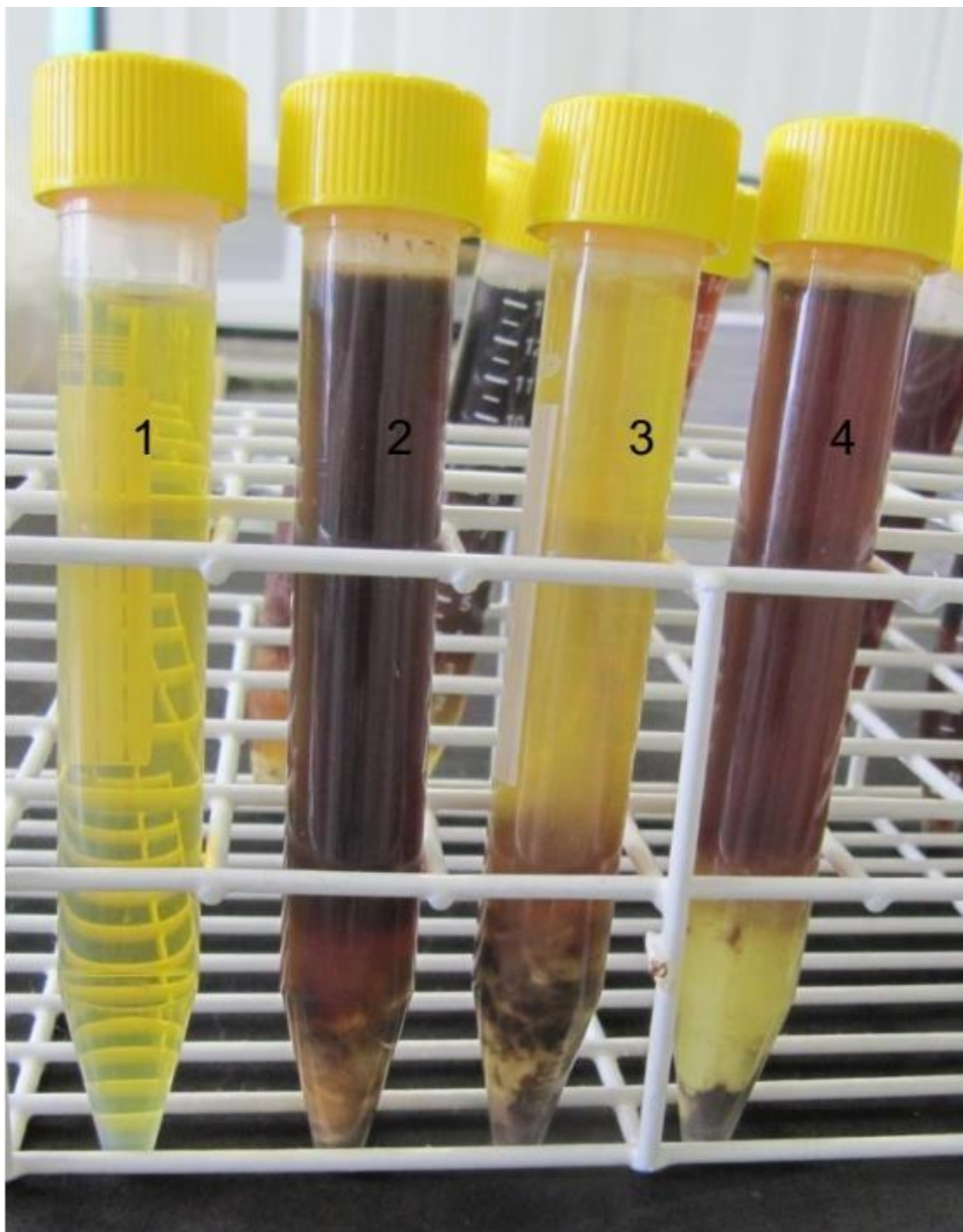
Foram colhidas 130 amostras de alimentos (queijos, pescados, produtos de origem animal e vegetal e alimentos prontos para consumo) adquiridas de estabelecimentos comerciais de três grandes cidades do Estado de São Paulo (São Paulo, Jundiaí e Santos) nos meses de agosto, setembro e outubro de 2020. As amostras foram obtidas de maneira casual, de acordo com a disponibilidade ofertada pelos estabelecimentos comerciais visitados. As amostras adquiridas foram levadas ao laboratório para posterior isolamento.

4.1. Isolamento

As amostras foram isoladas de acordo com a ISO 11290-1: 2017⁸¹, que foi tecnicamente revisada e substituiu a ISO 11290-1: 1996. Esta norma estabelece o enriquecimento primário da amostra em meio caldo Fraser e o enriquecimento secundário em meio Fraser. Os testes CAMP e catalase são opcionais, e o aspecto da confirmação microscópica é opcional no caso de uso de ágar específico para *Listeria* spp. patogênica. A norma técnica especifica um método horizontal para a detecção de *L. monocytogenes*, a detecção de *Listeria* spp. (incluindo *L. monocytogenes*) em produtos destinados ao consumo humano e à alimentação de animais e amostras ambientais na área da produção e manipulação de alimentos⁸¹. Tanto o Caldo Demi-Fraser Base (ISO) da Neogen® Corporation (Lansing, Michigan, EUA) quanto o meio Ágar Listeria Oxford Neogen®, utilizado no presente estudo em substituição ao meio Fraser, são cromogênicos, ou seja, têm a propriedade de alterar a sua cor (escurecer) na presença específica de *Listeria* spp.

As amostras de alimentos foram recolhidas após desinfecção dos materiais em câmara de fluxo laminar irradiada por luz ultravioleta (UV) por 30 minutos. O exterior de todas as amostras embaladas foi desinfetado com etanol a 70%. As amostras foram fragmentadas com o bisturi. No caso de queijos, foi respeitada a proporção de 10% de casca e 90% de massa⁸². As amostras foram colocadas em copos descartáveis estéreis de 50ml e pesadas em balança de precisão com tara previamente aferida. As amostras foram semeadas em caldo de cultura Demi-Fraser na proporção de 1g de amostra para 10ml de caldo e posteriormente incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (Figura 1).

Figura 1 – Meio de cultura cromogênico Demi-Fraser



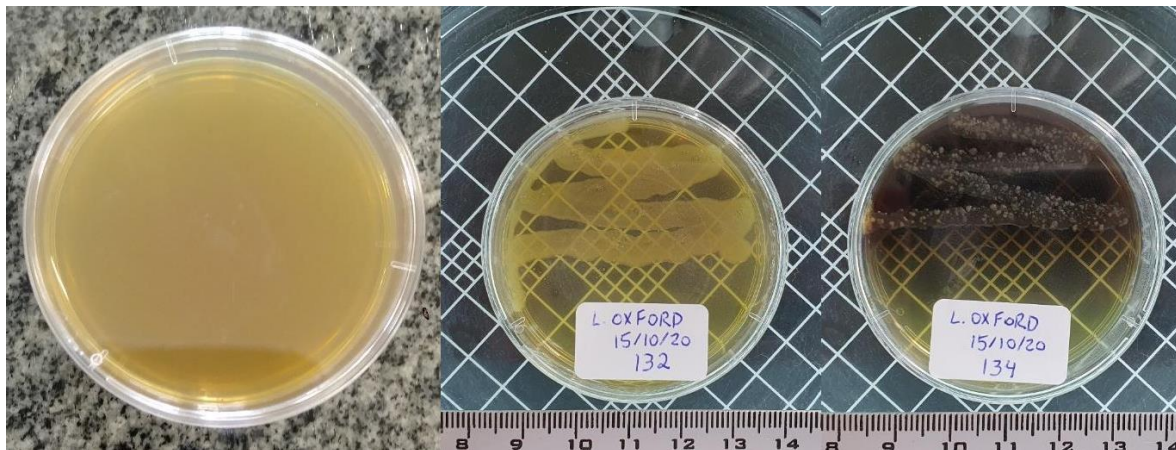
Amostras semeadas em caldo de cultura cromogênico Demi-Fraser após 24 horas. A amostra 1 corresponde ao controle negativo e as demais amostras (2, 3 e 4) correspondem a isolados de queijo cujo resultado cromogênico foi positivo.

Fonte: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha.

Os isolados cujo resultado cromogênico foi positivo (ou seja, que apresentaram alteração de cor do amarelo para o marrom) foram semeados em Agar de *Listeria* Oxford. Para isso, os tubos tipo Falcon de 15ml contendo as amostras em caldo de

cultura Demi-Fraser foram agitados no vórtex, e as amostras foram transferidas com swab para as placas contendo o Agar de Listeria Oxford. As placas de cultivo foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas (conforme Rocha *et al.* 2013¹⁹) (Figura 2).

Figura 2 – Meio de cultura cromogênico Listeria Oxford



Agar de Listeria Oxford e amostras semeadas após 48 horas. A amostra 132 corresponde a uma amostra de peixe que apresentou resultado cromogênico negativo e a amostra 134 corresponde a uma amostra de queijo que apresentou resultado cromogênico positivo. Fonte: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha e Alex de Camargo Coque.

Todos os isolados de *Listeria* Oxford foram transferidos para o caldo de enriquecimento *Brain-Heart Infusion* (BHI). Para isso, três a cinco colônias foram transferidas com alça de inoculação bacteriológica para tubos tipo Falcon de 15ml, contendo 10ml de caldo BHI. Os tubos foram mantidos em estufa a 37°C por dois dias. Posteriormente, os tubos tipo Falcon foram centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as colônias foram transferidas em duplicata para os meios estoque (BHI-Glicerol) e para tubos *ependorf* de 1,5ml com água ultrapura autoclavada para posterior extração de DNA. Foram transferidos aproximadamente 0,25ml para os *ependorfs* com 1ml de água milli q autoclavada e aproximadamente 0,75ml para criotubos com 1ml de meio estoque BHI-Glicerol. Os criotubos contendo as colônias em meio estoque BHI-Glicerol e os tubos *ependorf* contendo as amostras em água milli q autoclavada foram mantidos em *freezer* com temperatura de -14°C a -25°C.

4.2. Extração de DNA

As amostras suspensas em água milli q autoclavada foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos em centrífuga Eppendorf® Centrifuge 5804 R (Hamburg,

Germany). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 100 µl de água ultrapura. As amostras foram fervidas por 30 minutos a 100°C em termociclador Eppendorf® e novamente foram centrifugadas a 14000 rpm durante 5 minutos. O DNA em suspensão foi transferido para tubos tipo *eppendorf* de 1,5 ml.

4.3. Quantificação e diluição de DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro ThermoFischer Scientific® NanoDrop (Waltham, Massachusetts, EUA). Foram realizados os cálculos para diluição a 60 nanogramas por microlitro (µl). Preparou-se uma diluição da suspensão de DNA em água ultrapura e este foi armazenado em *freezer* para posterior realização de PCR.

4.4. Genotipagem por PCR

Os testes sorológicos tradicionais para detecção de anticorpos não foram utilizados para o diagnóstico de *L. monocytogenes*, pois, devido à baixa sensibilidade e especificidade, os resultados obtidos são pouco confiáveis⁶⁰. Após o isolamento nos meios cromogênicos, as 117 amostras que apresentaram resultado cromogênico positivo para pelo menos um meio (Demi Fraser) foram submetidas ao PCR.

Os sorotipos foram confirmados por meio de PCR multiplex, conforme previamente descrito^{19,83}. Os genes marcadores selecionados para o ensaio de PCR multiplex foram *Imo0737*, *ORF2819*, *ORF2110* e *prs*, utilizados para separar os quatro sorotipos principais (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) de cepas de *L. monocytogenes* em quatro grupos distintos, de acordo com a bibliografia⁹.

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 ultra pura, 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.

A Tabela 2 explicita as sequências genéticas utilizadas para a identificação dos sorotipos por PCR:

Tabela 2 – Sequências de primers utilizadas⁹

Gene-alvo	Iniciador direto e reverso (5'→3')	Especificidade	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do fragmento amplificado pela PCR (bp)
	(F) AGGGCTTCAAGGACTTACCC	<i>L.</i>		
<i>Imo0737</i>	(R) ACGATTTCTGCTTGCCATTC	<i>monocytogenes</i> serovars 1/2a, 3a, 1/2c and 3c	53	691
	(F) AGCAAATGCCAAACTCGT	<i>L.</i>		
<i>ORF2819</i>	(R) CATCACTAAAGCCTCCCATTG	<i>monocytogenes</i> serovars 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e and 7	53	471
	(F) AGTGGACAATTGATTGGTGAA			
<i>ORF2110</i>	(R) CATCCATCCCTTACTTTGGAC	<i>monocytogenes</i> serovars 4b, 4d	53	597
	(F) GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	All <i>Listeria</i>	53	370
<i>prs</i>	(R) CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	species		

5. RESULTADOS

Das amostras isoladas, 90% (117/130) apresentaram resultado cromogênico positivo para *Listeria* sp. em um meio de cultivo (Demi-Fraser) e 76,15% (99/130) apresentaram resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo (Demi-Fraser e Listeria Oxford).

Os resultados do presente estudo encontram-se expressos nas Tabelas 3 a 7. Informações como a marca, o distribuidor, a cadeia de mercado e outras que pudessem identificar o produto ou o fornecedor foram omitidas.

Tabela 3 – Amostras isoladas de queijos e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo

Amostra	Origem	Produto	Demi Fraser	Listeria Oxford	Imo0737	ORF2819	ORF2110	prs	Sorotipo
1	Feira 1 - Santos	queijo <i>emmental</i>	+	+	-	-	-	-	-
2	Feira 1 - Santos	queijo estepe	+	-	-	+	-	-	1/2b
3	Feira 1 - Santos	queijo meia-cura	+	+	-	-	-	-	-
4	Feira 1 - Santos	queijo frescal <i>light</i>	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
5	Feira 1 - Santos	queijo <i>gouda</i>	+	-	-	-	-	-	-
6	Feira 1 - Santos	queijo <i>gruyére</i>	+	-	-	+	-	+	1/2b
38	Mercado 2 - Jundiaí	queijo parmesão ralado	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
39	Restaurante 2 - Jundiaí	queijo parmesão ralado	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
43	Mercado 3 - Santos	queijo <i>brie</i>	+	+	-	-	-	-	-
44	Padaria 1 - Santos	queijo prato	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
46	Zona Cerealista - São Paulo	queijo gorgonzola	+	+	-	-	-	-	-
48	Mercado 5 - São Paulo	queijo ovelha	+	-	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
49	Mercado 5 - São Paulo	queijo gorgonzola	+	+	+	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
50	Mercado 5 - São Paulo	queijo minas frescal	+	-	-	+	-	-	1/2b
55	Mercado 1 - Santos	queijo prato	+	+	+	-	-	+	1/2a
56	Mercado 1 - Santos	queijo minas frescal	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
60	Mercado 1 - Santos	queijo gorgonzola	+	+	+	-	-	+	1/2a
63	Zona Cerealista - São Paulo	requeijão do norte	+	+	+	-	-	-	1/2a
64	Zona Cerealista - São Paulo	queijo gorgonzola	+	+	+	-	-	-	1/2a
65	Padaria 1 - Santos	queijo prato	+	-	+	-	-	-	1/2a
66	Zona Cerealista - São Paulo	queijo meia-cura	+	-	-	+	+	+	4b
67	Zona Cerealista - São Paulo	queijo coalho	+	+	+	+	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
68	Zona Cerealista - São Paulo	queijo <i>brie</i>	+	+	+	-	-	+	1/2a
74	Lanchonete 2 - São Paulo	queijo muçarela	+	+	+	+	-	+	<i>L. monocytogenes</i>

Amostra	Origem	Produto	<u>Demi Fraser</u>	<u>Listeria Oxford</u>	<i>Imo0737</i>	<i>ORF2819</i>	<i>ORF2110</i>	<i>prs</i>	Sorotipo
86	Feira 1 - Santos	queijo muçarela	+	+	-	+	-	-	1/2b
91	Padaria 1 - Santos	queijo prato	+	+	-	+	-	-	1/2b
92	Mercado 3 - Santos	queijo gorgonzola	+	+	-	+	-	+	1/2b
94	Feira 1 - Santos	queijo prato esférico	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
96	Mercado 3 - Santos	queijo prato	+	+	-	-	-	-	-
98	Mercado 3 - Santos	queijo gorgonzola	+	+	-	-	-	-	-
113	Feira 7 - São Paulo	queijo <i>brie</i>	+	+	-	-	-	-	-
117	Padaria 1 - Santos	queijo prato	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
131	Feira 9 - São Paulo	queijo parmesão ralado	+	+	-	+	-	-	1/2b
133	Feira 10 - São Paulo	queijo temperado	+	+	-	+	-	-	1/2b
134	Feira 10 - São Paulo	queijo frescal	+	+	+	-	-	-	1/2a
135	Feira 10 - São Paulo	queijo meia-cura	+	+	-	-	-	-	-

Tabela 4 – Amostras isoladas de peixes e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo

Amostra	Origem	Produto	Demi Fraser	Listeria Oxford	Imo0737	ORF2819	ORF2110	prs	Sorotipo
9	Feira 1 - Santos	pescada branca cauda	+	+	+	-	-	+	1/2a
10	Feira 1 - Santos	pescada branca cabeça	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
13	Mercado 1 - Santos	pescadinha	+	+	+	+	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
14	Mercado 1 - Santos	tilápia	+	+	-	-	-	-	-
15	Mercado 1 - Santos	água limpeza peixe	+	+	-	-	-	-	-
17	Mercado 1 - Santos	sardinha	+	+	-	-	-	-	-
45	Feira 1 - Santos	pescada amarela	+	+	+	-	-	+	1/2a
76	Feira 2 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	+	+	+	4b
77	Feira 3 - São Paulo	água limpeza peixe	+	-	-	-	-	-	-
78	Feira 4 - São Paulo	água limpeza peixe	+	-	-	+	-	-	1/2b
79	Feira 5 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	-	-	-	-
87	Feira 1 - Santos	pescada amarela	+	+	-	-	-	-	-
88	Feira 1 - Santos	pescada amarela	+	+	-	+	-	-	1/2b
89	Feira 1 - Santos	pescada amarela	+	+	-	+	-	-	1/2b
99	Feira 1 - Santos	pescada amarela	+	+	-	-	-	-	-
100	Feira 6 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	-	-	-	-
101	Feira 6 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	+	-	+	1/2b
102	Feira 7 - São Paulo	água limpeza peixe	+	-	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
103	Feira 7 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	-	-	-	-
107	Feira 7 - São Paulo	cação	+	+	-	-	-	-	-
108	Feira 6 - São Paulo	manjuba	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
110	Feira 6 - São Paulo	sardinha	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.
111	Feira 6 - São Paulo	manjuba	+	+	-	-	-	-	-
114	Feira 6 - São Paulo	sardinha	+	+	-	-	-	-	-
119	Feira 8 - São Paulo	água limpeza peixe	+	-	-	-	-	-	-
122	Feira 8 - São Paulo	manjuba	+	+	-	-	-	-	-
124	Feira 9 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	-	-	-	-

Amostra	Origem	Produto	Demi Fraser	Listeria Oxford	Imo0737	ORF2819	ORF2110	prs	Sorotipo
126	Feira 9 - São Paulo	manjuba	+	+	-	+	-	-	1/2b
127	Feira 9 - São Paulo	sardinha	+	+	-	-	-	-	-
129	Feira 9 - São Paulo	porquinho	+	+	-	+	+	+	4b
132	Feira 10 - São Paulo	água limpeza peixe	+	-	-	+	-	-	1/2b
136	Feira 10 - São Paulo	água limpeza peixe	+	+	-	+	-	-	1/2b
137	Feira 10 - São Paulo	sardinha	+	+	-	-	-	-	-
141	Feira 10 - São Paulo	manjuba	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria</i> sp.

Tabela 5 – Amostras isoladas de outros pescados e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo

Amostra	Origem	Produto	Demi Fraser	Listeria Oxford	Imo0737	ORF2819	ORF2110	prs	Sorotipo
7	Feira 1 - Santos	camarão rosa grande	+	+	-	-	-	-	-
8	Feira 1 - Santos	camarão branco médio	+	+	-	-	-	-	-
16	Mercado 1 - Santos	lula	+	+	+	-	-	+	1/2a
18	Mercado 1 - Santos	camarão cinza	+	+	+	-	-	+	1/2a
84	Feira 1 - Santos	lula	+	+	-	-	-	-	-
85	Feira 1 - Santos	camarão	+	+	-	+	-	-	1/2b
105	Feira 7 - São Paulo	lula	+	+	-	-	-	-	-
106	Feira 7 - São Paulo	camarão	+	+	-	+	-	-	1/2b
109	Feira 6 - São Paulo	camarão	+	+	-	-	-	-	-
112	Feira 6 - São Paulo	camarão	+	+	-	-	-	-	-
120	Feira 8 - São Paulo	lula	+	+	-	-	-	-	-
121	Feira 8 - São Paulo	camarão branco	+	+	-	-	-	-	-
123	Feira 8 - São Paulo	camarão rosa	+	+	-	+	-	+	1/2b
125	Feira 9 - São Paulo	camarão cinza	+	+	-	-	-	-	-
128	Feira 9 - São Paulo	marisco	+	+	-	-	-	-	-
130	Feira 9 - São Paulo	lula	+	+	-	+	-	+	1/2b
138	Feira 10 - São Paulo	camarão branco	+	+	-	-	-	-	-
139	Feira 10 - São Paulo	camarão branco	+	+	-	-	-	-	-
140	Feira 10 - São Paulo	lula	+	+	-	+	-	-	1/2b

Tabela 6 – Amostras isoladas de outros produtos de origem animal e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo

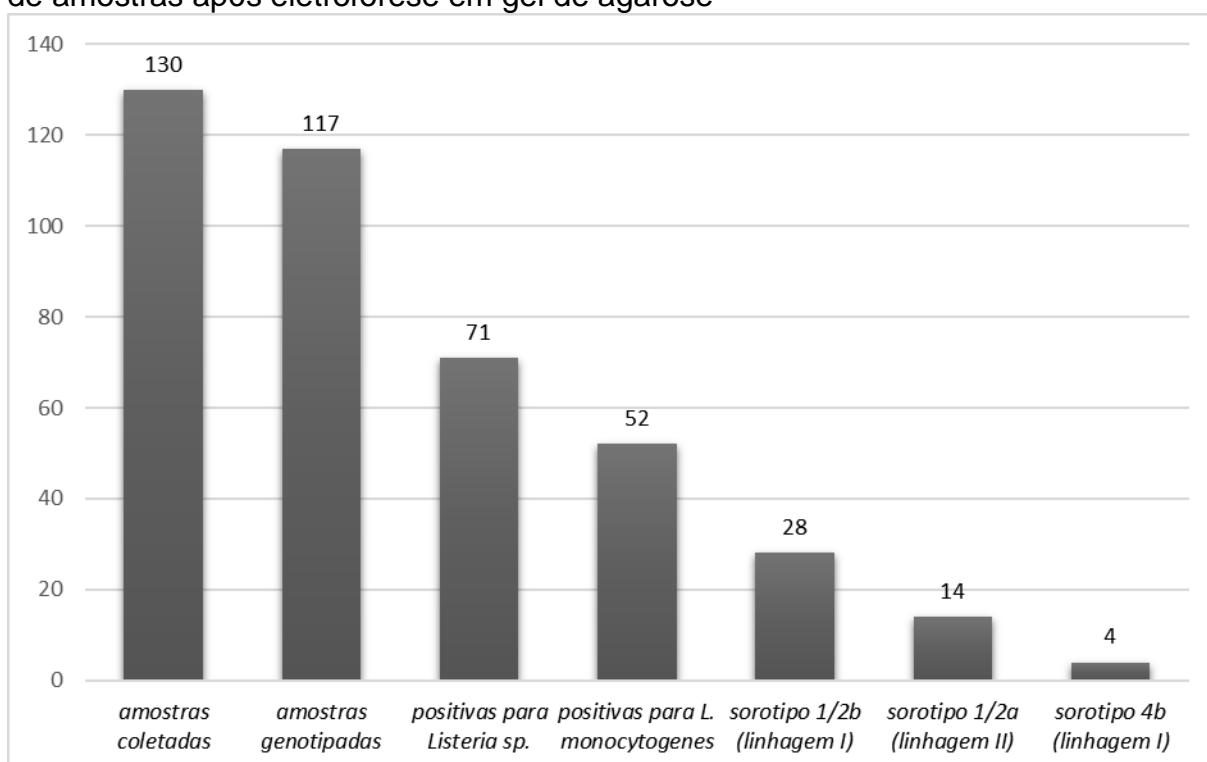
Amostra	Origem	Produto	<u>Demi Fraser</u>	<u>Listeria Oxford</u>	<i>Imo0737</i>	<i>ORF2819</i>	<i>ORF2110</i>	<i>prs</i>	Sorotipo
22	Padaria 1 - Santos	presunto	+	+	-	+	-	+	1/2b
29	Padaria 2 - Santos	manteiga	-						
30	Mercado 1 - Santos	maionese	+	-	-	+	-	+	1/2b
32	Mercado 2 - Jundiaí	ovo superfície	+	-	-	+	-	-	1/2b
33	Mercado 2 - Jundiaí	ovo cru	-						
47	Zona Cerealista - São Paulo	bacon	+	+	+	+	+	+	<i>L. monocytogenes</i>
51	Mercado 1 - Santos	calabresa	-						
52	Mercado 1 - Santos	contra-filé cru	+	+	+	-	-	+	1/2a
53	Mercado 1 - Santos	iogurte morango	+	-	-	-	-	-	-
54	Mercado 1 - Santos	leite condensado	+	-	+	-	-	-	1/2a
57	Mercado 1 - Santos	mortadela	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
58	Mercado 1 - Santos	presunto	+	+	-	+	-	-	1/2b
59	Mercado 1 - Santos	manteiga	-						
61	Mercado 1 - Santos	leite fermentado	-						
69	Padaria 1 - Santos	presunto	+	+	-	-	-	-	-
70	Feira 1 - Santos	calabresa	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
71	Feira 1 - Santos	bacon	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
72	Mercado 4 - São Paulo	leite	-						
83	Padaria 1 - Santos	presunto	+	+	-	-	-	-	-
90	Açougue 1 - Santos	filé mignon cru	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
93	Padaria 1 - Santos	salame	+	-	-	-	-	-	-
95	Açougue 2 - Santos	linguiça apimentada	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
97	Mercado 3 - Santos	presunto	+	+	-	-	-	-	-
115	Feira 1 - Santos	calabresa	+	+	-	-	-	+	<i>Listeria sp.</i>
116	Feira 1 - Santos	bacon	+	+	-	-	-	-	-
118	Padaria 1 - Santos	mortadela	+	+	-	+	-	-	1/2b

Tabela 7 – Amostras isoladas de outros produtos de origem vegetal e resultados obtidos para cada meio cromogênico e para os genes-alvo

Amostra	Origem	Produto	Demi Fraser	Listeria Oxford	Imo0737	ORF2819	ORF2110	prs	Sorotipo
23	Restaurante 1 - Santos	alface pronto consumo	+	+	-	+	-	+	1/2b
24	Restaurante 1 - Santos	cebola pronta consumo	+	+	-	+	-	+	1/2b
25	Restaurante 1 - Santos	feijão pronto consumo	-						
27	Lanchonete 1 - Santos	mostarda	-						
28	Lanchonete 1 - Santos	<i>catchup</i>	-						
31	Mercado 1 - Santos	arroz cru	+	+	-	+	-	-	1/2b
35	Mercado 2 - Jundiá	tempero fresco	-						
36	Mercado 2 - Jundiá	tempero com sal	-						
62	Zona Cerealista - São Paulo	azeitona	+	+	+	-	-	+	1/2a
73	Lanchonete 2 - São Paulo	<i>catchup</i>	+	+	-	-	-	-	-
75	Lanchonete 2 - São Paulo	alface pronto consumo	+	+	+	+	-	-	<i>L. monocytogenes</i>
80	Feira 2 - São Paulo	vinagrete	+	-	-	-	-	-	-
81	Feira 3 - São Paulo	vinagrete	-						
82	Feira 5 - São Paulo	vinagrete	-						
104	Feira 7 - São Paulo	vinagrete	+	+	-	+	+	-	4b

Os resultados específicos para *Listeria monocytogenes* foram obtidos na execução da etapa de PCR. Foi possível identificar por meio da eletroforese que 54,62% das amostras (71/130) foram positivas para o gênero *Listeria*, sendo que destas 40% (52/130) foram positivas para *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 21,54% das amostras (28/130) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 10,77% (14/130) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II; e 3,08% (4/130) pertencem ao sorotipo 4b, linhagem I (Figura 3).

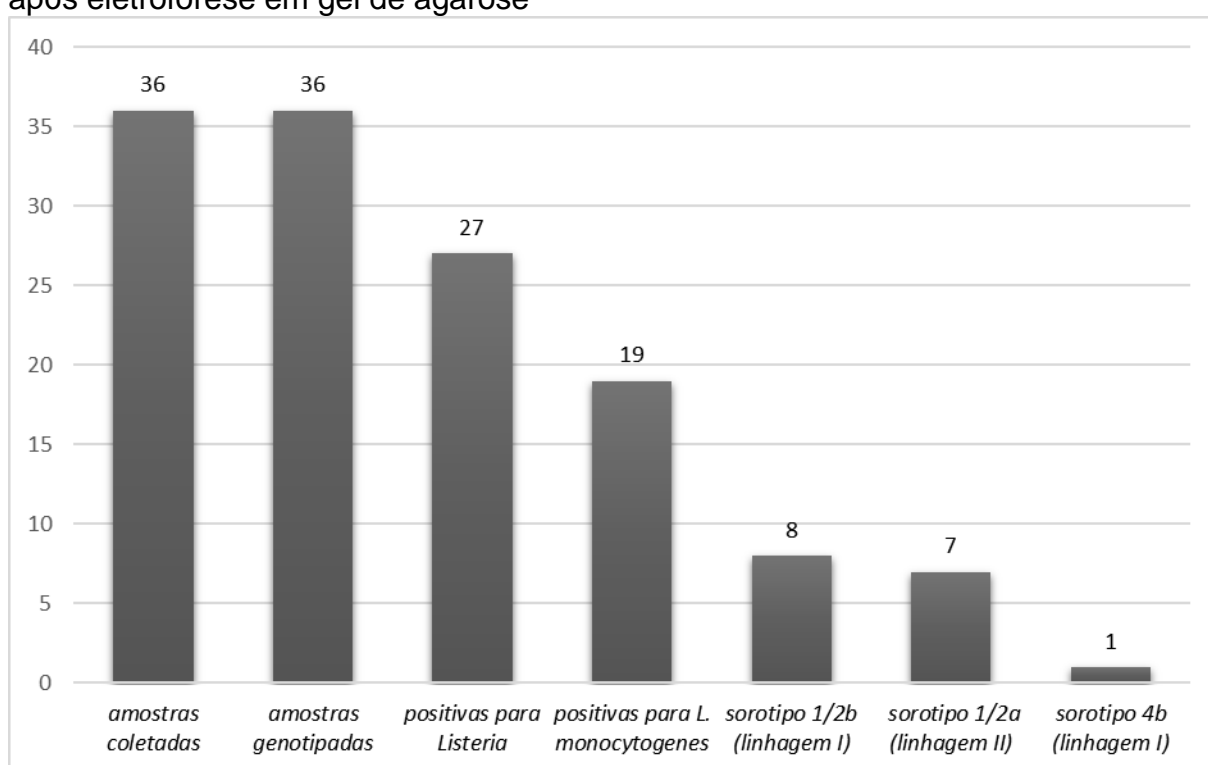
Figura 3 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para o total de amostras após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

Das amostras de queijos, todas foram genotipadas por PCR por terem apresentado resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo. Foi possível identificar por meio da eletroforese que 75% (27/36) foram positivas para o gênero *Listeria*, sendo que 52,78% (19/36) foram positivas para *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 22,22% (8/36) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 19,44% (7/36) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II; e 2,78% (1/36) pertencem ao sorotipo 4b, linhagem I (Figura 4).

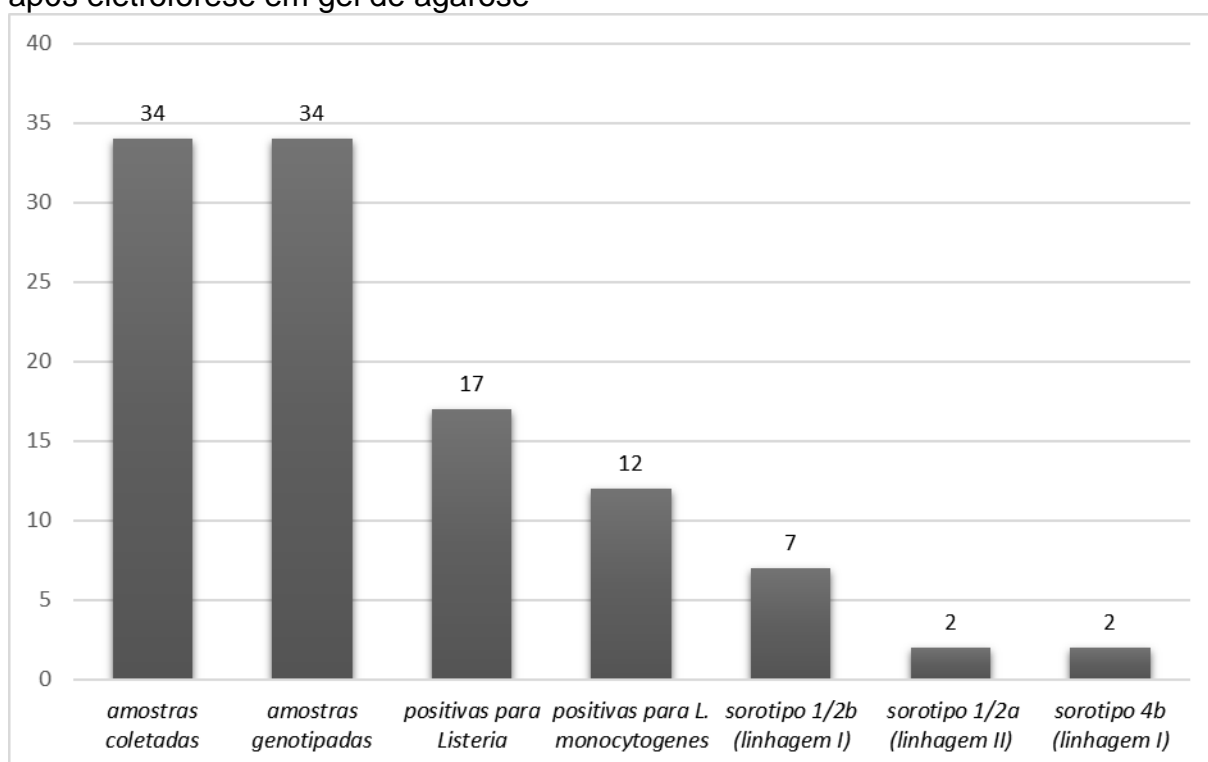
Figura 4 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para queijos após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

Das amostras de peixes, todas também foram genotipadas por PCR por terem apresentado resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo. Foi possível identificar por meio da eletroforese que 50% (17/34) foram positivas para o gênero *Listeria*, sendo que 35,29% (12/34) foram positivas para *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 20,59% (7/34) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 5,88% (2/34) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II; e 5,88% (2/34) pertencem ao sorotipo 4b, linhagem I (Figura 5).

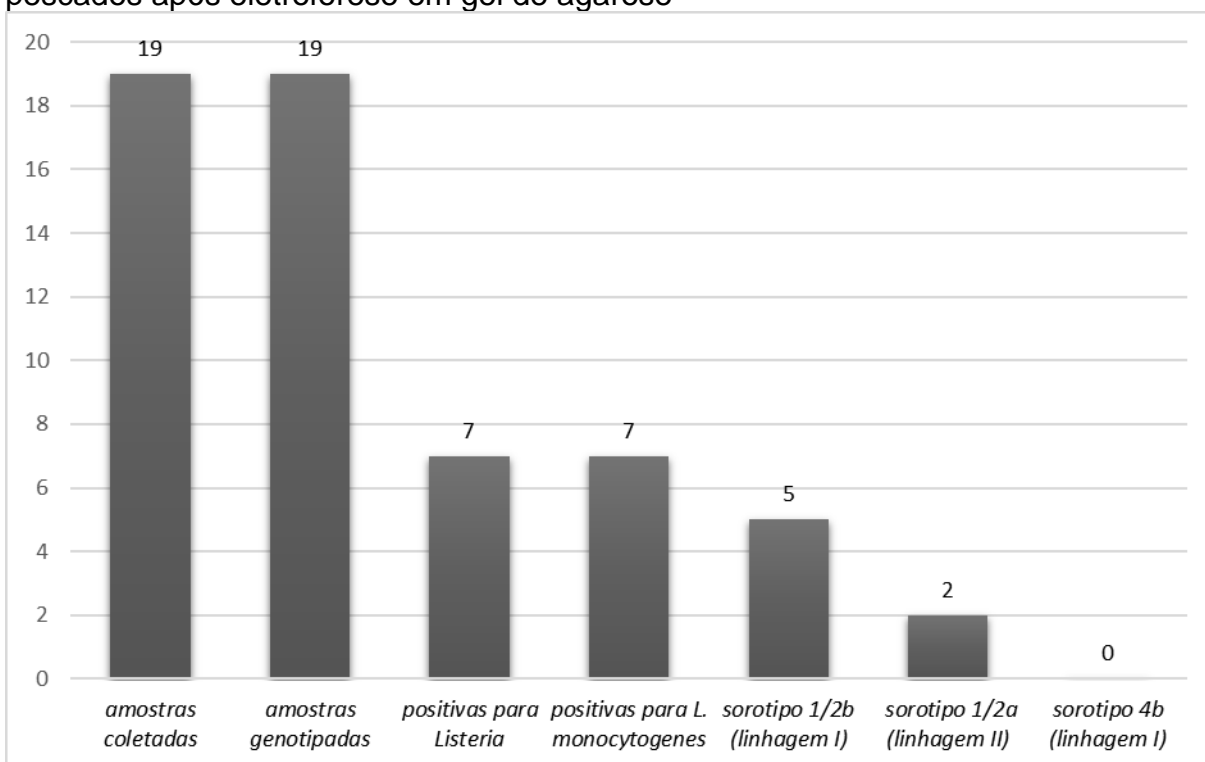
Figura 5 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para peixes após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

Das amostras de outros pescados, todas também foram genotipadas por PCR por terem apresentado resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo. Foi possível identificar por meio da eletroforese que 36,84% (7/19) foram positivas para o gênero *Listeria* e para *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 26,32% (5/19) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; e 10,53% (2/19) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II (Figura 6).

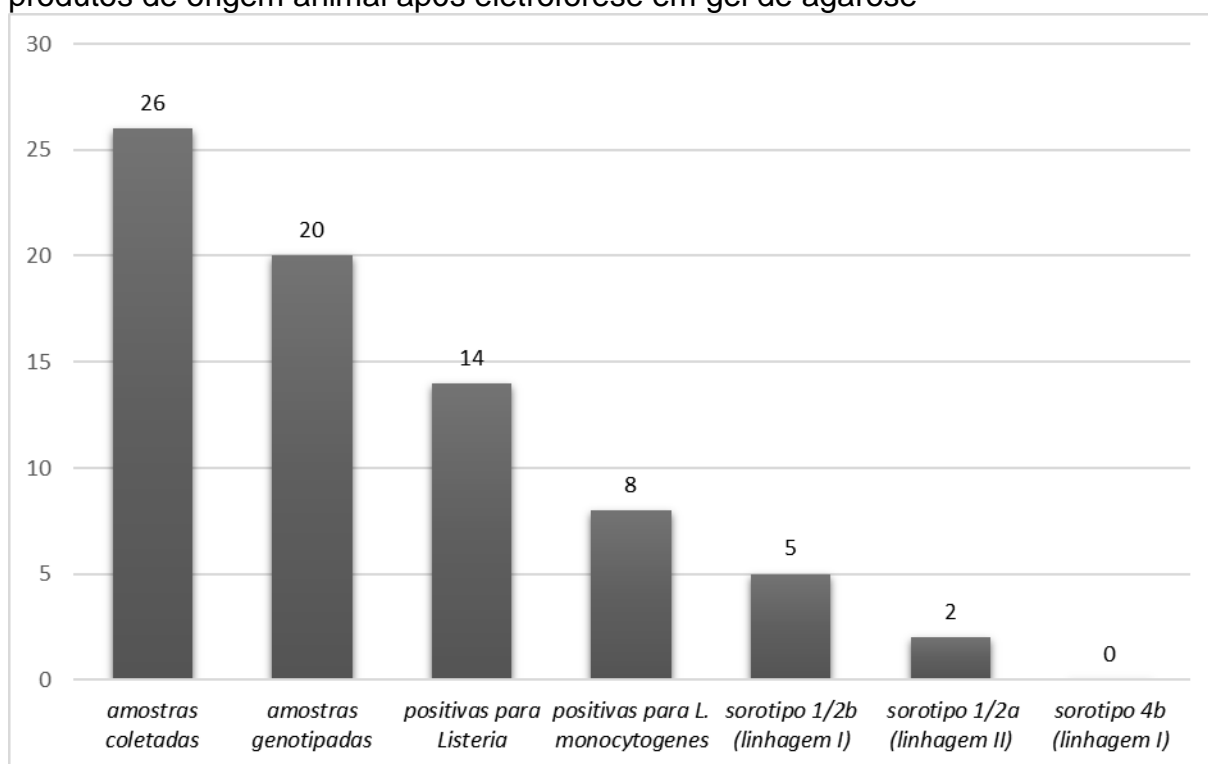
Figura 6 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para outros pescados após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

Das amostras de outros produtos de origem animal, 76,92 (20/26) foram genotipadas por PCR por terem apresentado resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo. Do total de amostras, foi possível identificar por intermédio da eletroforese que 53,85% (14/26) foram positivas para o gênero *Listeria* e 30,77% (8/26) foram positivas para *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 19,23% (5/26) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; e 7,69% (2/26) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II (Figura 7).

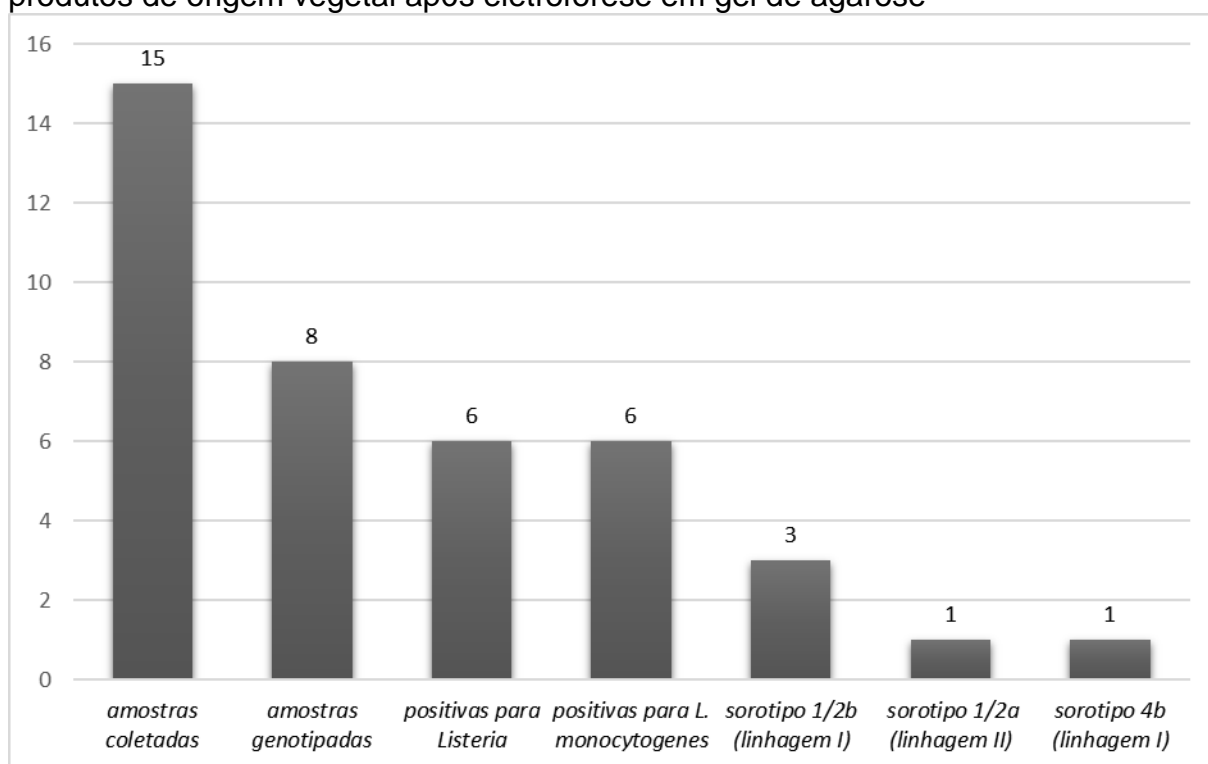
Figura 7 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para outros produtos de origem animal após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

Das amostras de outros produtos de origem vegetal, 53,33% (8/15) foram genotipadas por PCR por terem apresentado resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo. Do total de amostras, foi possível identificar por meio da eletroforese que 40% (6/15) foram positivas para o gênero *Listeria* e para a espécie *L. monocytogenes*. Em relação aos sorotipos, 20% (3/15) pertencem ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 6,67% (1/15) pertencem ao sorotipo 1/2a, linhagem II; e 6,67% (1/15) pertencem ao sorotipo 4b, linhagem I (Figura 8).

Figura 8 – Amostras positivas para *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* para outros produtos de origem vegetal após eletroforese em gel de agarose



Fonte: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

7. DISCUSSÃO

Devido à prevalência de *L. monocytogenes* em isolados de alimentos ser alta, esperava-se identificar e caracterizar este agente nas amostras analisadas. A prevalência de *L. monocytogenes* no total de amostras de alimentos isoladas no presente estudo foi de 40% (52/130). A prevalência de isolamentos positivos para *L. monocytogenes* obtida superou a prevalência obtida na maioria dos estudos possivelmente pelo fato deste ter se utilizado de meios específicos de acordo com a metodologia padronizada recentemente pela ISO 11290-1: 2017⁸¹, bem como de técnicas de biologia molecular, como o PCR, ao contrário da maioria dos estudos brasileiros, que se utilizaram de técnicas bioquímicas.

A prevalência de *Listeria monocytogenes* nas amostras de queijos isoladas foi de 52,78% (19/36). Estudos demonstram que o isolamento de *L. monocytogenes* em laticínios varia entre 0 a 41,4%⁴¹, percentual inferior ao obtido no presente estudo. Amostras de queijo estepe, *gruyère*, minas frescal, prato, gorgonzola, requeijão do norte, meia cura, *brie*, muçarela, parmesão ralado e queijo temperado apresentaram contaminação por algum sorotipo conhecido de *L. monocytogenes*. De uma amostra de queijo meia cura, foi isolada uma cepa pertencente ao sorotipo 4b, pertencente à linhagem I, conhecidamente patogênica e responsável pela maioria dos surtos de listeriose³⁷. Os resultados do presente estudo enfatizam a necessidade de uma maior vigilância sanitária no que tange a este produto, relatado na bibliografia como aquele que mais tem apresentado contaminação por *L. monocytogenes* no Brasil⁴¹.

Em relação aos peixes e a outros pescados, a prevalência de *Listeria monocytogenes* nas amostras analisadas por PCR foi de 35,85% (19/53). Amostras de pescada branca, pescada amarela, manjuba, porquinho, água decorrente da limpeza de peixes, lula e camarão apresentaram contaminação por algum sorotipo conhecido de *L. monocytogenes*. De duas destas amostras (uma de água decorrente da limpeza de peixes e uma de peixe porquinho), foram isoladas cepas pertencentes ao sorotipo 4b. Um estudo chinês⁶⁸ obteve a prevalência de 7,92% de isolados de *L. monocytogenes* em peixes e um estudo polonês⁴² obteve a prevalência de 18%.

Dentre as 20 amostras genotipadas de outros alimentos de origem animal que apresentaram resultado cromogênico positivo para os dois meios de cultivo (Demi-Fraser e *Listeria* Oxford), encontram-se produtos cárneos (embutidos e carnes cruas), laticínios e alimentos prontos para consumo. A prevalência de *Listeria monocytogenes*

no total de 26 amostras de outros alimentos de origem animal foi de 30,77% (8/26). Amostras de alimentos prontos para consumo (presunto, maionese, leite condensado e mortadela), bem como de alimentos não processados (ovo e contra-filé cru) apresentaram contaminação por algum sorotipo conhecido de *L. monocytogenes* (1/2a, linhagem II e 1/2b, linhagem I). Em nenhuma das amostras foi identificado o sorotipo 4b. Este resultado não diminui o risco associado destes alimentos para a veiculação do patógeno *L. monocytogenes*, já que o sorotipo 1/2a pertence à linhagem I, conhecida patogênica, e cepas do sorotipo 1/2b da linhagem II, também isolados nestas amostras, são comumente isoladas de casos de listeriose em animais e também são responsáveis por casos clínicos humanos esporádicos³⁵. O sorotipo 1/2b pertence à linhagem II, difundidos nos ambientes naturais e agrícolas e cujos plasmídeos abrigam um sistema de resistência a metais pesados que possivelmente fornecem uma maior tolerância aos desinfetantes¹⁵. O sorotipo 1/2b tem sido associado a infecções esporádicas por *L. monocytogenes*^{30,35}.

Já dentre as 15 amostras colhidas de alimentos de origem vegetal, 8 apresentaram resultado cromogênico para os dois meios de cultura e foram genotipadas. A prevalência obtida para *L. monocytogenes* foi de 40% (6/15). Amostras de alface pronto para consumo, cebola pronta para consumo, arroz cru, azeitona e vinagrete apresentaram contaminação por algum sorotipo conhecido de *L. monocytogenes*. De uma amostra de vinagrete obtida de uma feira do município de São Paulo, foi isolada uma cepa pertencente ao sorotipo 4b, reforçando a participação de produtos prontos para o consumo na veiculação de cepas patogênicas de *L. monocytogenes* e o potencial risco que estes produtos podem oferecer para a saúde pública, já que alimentos prontos para consumo estão predominantemente associados à listeriose humana causada por *L. monocytogenes*⁸⁴.

Embora 13 sorotipos sejam descritos para a espécie *L. monocytogenes*, pelo menos 95% das cepas isoladas de alimentos e pacientes são dos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, e todos os principais surtos da forma invasiva de listeriose são devidos às cepas do sorotipo 4b⁹. Os resultados parciais do presente estudo indicam que 3,42% (4/117) das cepas genotipadas pertencem ao sorotipo 4b, o que pode ser um indicativo de que os produtos amostrados e cujo resultado foi positivo para o sorotipo 4b (queijo meia-cura, água da limpeza de peixe, peixe porquinho e vinagrete) possam representar um risco à saúde pública, já que o sorotipo é prevalente em casos clínicos humanos⁷⁷.

Poucos são os estudos nacionais que se utilizaram de metodologias moleculares na identificação e caracterização de *L. monocytogenes* no Brasil. A maioria dos estudos brasileiros utilizou-se de testes bioquímicos para a identificação de *L. monocytogenes*, de maneira que os resultados obtidos são pouco confiáveis devido à limitação de sensibilidade e especificidade inerente aos testes sorológicos. O presente estudo utilizou meios cromogênicos específicos e foi realizado com o uso de metodologias moleculares com sensibilidade e especificidade altas (PCR)⁹. Portanto, a confirmação da prevalência de *L. monocytogenes* nas amostragens foi realizada de forma segura e foi obtida uma prevalência alta, com resultados precisos.

Na maioria dos eventos de identificação de *L. monocytogenes* em alimentos no Brasil, não se tem notícia sobre sorotipos, linhagens ou eventuais complexos clonais isolados, reforçando a necessidade de utilização de metodologias com alto poder discriminante (permitir a diferenciação clara de um elevado número de amostras) e concordância epidemiológica (apresentar um alto grau de confiabilidade em comparação com outros testes), como a MLST, para caracterização epidemiológica.

A incidência de DTAs vem aumentando de forma significativa em todo o mundo. Dentre os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças podemos citar os seguintes: o crescente aumento das populações; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala; o deficiente controle dos órgãos públicos e privados com relação à qualidade dos alimentos ofertados às populações; maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (*fast-foods*); o consumo de alimentos em vias públicas; a utilização de novas modalidades de produção; o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, bem como mudanças ambientais; a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive no nível internacional. O Brasil é um dos maiores exportadores de alimentos do mundo, e pode estar sendo um disseminador global de cepas patogênicas de *L. monocytogenes*.

A erradicação de *L. monocytogenes* ainda é um grande desafio para a indústria alimentícia e as autoridades de controle, uma vez que alguns complexos clonais (CCs) estão melhor adaptados aos ambientes de processamento de alimentos ou são globalmente difundidos¹⁵. A contaminação cruzada representa um sério risco à população e pode ocorrer tanto no ambiente rural quanto na produção de alimentos prontos para consumo^{19,29}, já que a presença de *L. monocytogenes* é frequentemente

detectada em plantas de processamento de produtos de origem animal, possibilitando a incorporação da bactéria ao produto final devido à manipulação inadequada de produtos^{26,78}.

Para diminuir a prevalência e incidência de listeriose, bem como os prejuízos econômicos na cadeia de produção, relacionados a surtos e falhas no processamento em fábricas que não seguem a regulamentação e causam prejuízos econômicos⁵⁷ e na comercialização de alimentos de origem animal, é preciso estabelecer normas regulatórias efetivas; intensificar a fiscalização de produtos de origem animal²⁶, desde a obtenção da matéria-prima até o acesso do produto final pelo consumidor; desenvolver uma estratégia de educação sanitária junto à população. Diante da ausência de vigilância constante por parte das autoridades sanitárias brasileiras, faz-se necessária a investigação deste agente bacteriano, por tratar-se de uma questão de saúde pública e veterinária.

8. CONCLUSÕES

O presente estudo identificou uma prevalência de 40% de *L. monocytogenes* em alimentos comercializados em feiras e comércios do Estado de São Paulo (queijos, pescados, produtos de origem animal e vegetal e alimentos prontos para consumo). Nos resultados parciais foi possível identificar que os isolados pertenciam aos sorotipos 1/2a, 4b e 1/2b e às linhagens I e II. Das amostras genotipadas, foi possível identificar que 71 delas pertencem ao gênero *Listeria* sp., e dessas, 52 foram identificadas como *Listeria monocytogenes*. Também foi possível identificar 28 amostras pertencentes ao sorotipo 1/2b, linhagem I; 14 do sorotipo 1/2b, linhagem II; e 4 do sorotipo 4b, linhagem I.

A combinação de métodos de subtipagem fenotípica e genotípica das amostras isoladas tem-se demonstrado altamente eficaz na investigação de surtos da listeriose. Os resultados do presente estudo sugerem que cepas patogênicas de *L. monocytogenes* estão circulando em alimentos frescos e/ou prontos para o consumo, o que representa risco de saúde pública. Os resultados do presente estudo auxiliam a estabelecer a prevalência de *L. monocytogenes* em alimentos e fornecem subsídios para que se estabeleça uma vigilância efetiva para a incidência de *L. monocytogenes* em alimentos no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Phraephaisarn C, Khumthong R, Takahashi H, et al. A novel biomarker for detection of *Listeria* species in food processing factory. *Food Control*. Published online 2017. doi:10.1016/j.foodcont.2016.10.001
2. Narayanan S. *Listeria*. In: McVey D, Kennedy M, Chengappa M, eds. *Veterinary Microbiology*. 3rd ed. Wiley-Blackwell; 2013:223-225.
3. Rocha PRDA, Dalmaso A, Grattarola C, et al. Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res Vet Sci*. Published online 2013. doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.017
4. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(1):136. doi:10.3201/eid1601.091155
5. Murray P, Rosenthal K, Pfalle M. *Microbiología Médica*.; 2014.
6. Barancelli G V., Silva-Cruz J V., Porto E, Oliveira CAF. *Listeria Monocytogenes*: Ocorrência Em Produtos Lácteos E Suas Implicações Em Saúde Pública. *Arq Inst Biol*. 2011;78(1):155-168.
7. Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety: Third Edition*.; 2007.
8. Franco BDG de M, Landgraf M. *Microbiologia Dos Alimentos*. Atheneu; 2008.
9. 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. doi:10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004
10. Melo J, Andrew PW, Faleiro ML. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res Int*. 2015;67:75-90.
11. Bolocan AS, Pennone V, O'Connor PM, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J Appl Microbiol*. 2017;122(1):279-293.
12. 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):41.
13. Oloketuyi SF, Khan F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms—Current knowledge and future outlooks. *J Basic Microbiol*. 2017;57(9):728-743.

14. Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, et al. Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *Int J Food Microbiol.* 2019;296:75-82.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.02.021
15. Muhterem-Uyar M, Ciolacu L, Wagner KH, Wagner M, Schmitz-Esser S, Stessl B. New aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment. *Front Microbiol.* 2018;9:1-14. doi:10.3389/fmicb.2018.00064
16. Maury MM, Bracq-Dieye H, Huang L, et al. Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-10380-0
17. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881.
18. Skowron K, Wałeczka-Zacharksa E, Grudlewska K, et al. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission. *Polish J Microbiol.* 2019;68(3):353-369. doi:10.33073/pjm-2019-038
19. Dell'Armeline Rocha PR, Lomonaco S, 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):3059-3066. doi:10.1128/AEM.00219-13
20. Oevermann A, Zurbriggen A, Vandeveld M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise? *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2010;2010.
21. Chen Y, Knabel SJ. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *L. monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(19):6299-6304. doi:10.1128/AEM.00961-07
22. Cardenas-Alvarez MX, Ramsett MKT, Malekmohammadi S, Bergholz TM. Evidence of hypervirulence in *Listeria monocytogenes* clonal complex 14. *J Med Microbiol.* 2019;68(11):1677-1685.
23. Hurley D, Luque-Sastre L, Parker CT, et al. Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from

- Food Processing Environments over a Four-Year Period . *mSphere*. 2019;4(4):1-14. doi:10.1128/msphere.00252-19
24. Nayaranan S. Veterinary Microbiology. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. 3rd ed. Wiley-Blackwell; 2013.
 25. Kasnowski MC, Valente AM, Franco RM, Oliveira LAT, Carvalho JCA. *Listeria* spp: um patógeno emergente. Published online 2007:52-57.
 26. Pirola S, Mantilla S, Franco RM, Trindade LA. Importância Da *Listeria Monocytogenes* Em Alimentos De Origem Animal. *Rev da FZVA*. 2007;14(1):180-192.
http://file.aviculturaindustrial.com.br/Material/Tecnico/listeriose_puc.pdf
 27. CFSAN. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. In: Food and Drug Administration, ed. *Bad Bug Book*. BrainFeed. BrainFeed Press; 2000. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/preface.html>
 28. Papić B, Golob M, Kušar D, Pate M, Zdovc I. Source tracking on a dairy farm reveals a high occurrence of subclinical mastitis due to hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complexes. *J Appl Microbiol*. 2019;127(5):1349-1361. doi:10.1111/jam.14418
 29. Lomonaco S, Nucera D, Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol*. 2015;35:172-183. doi:10.1016/j.meegid.2015.08.008
 30. Chen J-Q, Regan P, Laksanalamai P, Healey S, Hu Z. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Sci Hum Wellness*. 2017;6(3):97-120. doi:10.1016/j.fshw.2017.06.002
 31. MORENO AM, PAIXÃO R, MORENO LZ, de GOBBI DDS. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2013;50(2):136-144.
 32. Nyarko EB, Donnelly CW. *Listeria monocytogenes*: strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. *J Food Sci*. 2015;80(12):M2868-M2878.
 33. McLauchlin J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9(3):210-213.
 34. Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria*

- monocytogenes lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun.* 1997;65(7):2707-2716.
35. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(2):79-96.
 36. Senay TE, Ferrell JL, Garrett FG, et al. Neurotropic Lineage III Strains of *Listeria monocytogenes* Disseminate to the Brain without Reaching High Titer in the Blood. *Msphere.* 2020;5(5).
 37. Cruz CD, Martinez MB, Destro MT. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Aliment e Nutr Araraquara.* 2009;19(2):195-206.
 38. Zhang Y, Dong S, Chen H, et al. Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. *Front Microbiol.* 2019;10:1-14.
doi:10.3389/fmicb.2019.01710
 39. Wagner M, MacLauchlin J. Handbook of *Listeria monocytogenes*. In: Liu D., ed. CRC Press; 2008:3-25.
 40. Chen Y, Zhang W, Knabel SJ. Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):835-846. doi:10.1128/JCM.01575-06
 41. Oxaran V, Lee SHI, Chaul LT, et al. *Listeria monocytogenes* incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiol.* 2017;68:16-23. doi:10.1016/j.fm.2017.06.012
 42. Wieczorek K, Osek J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* 2017;64:164-171. doi:10.1016/j.fm.2016.12.022
 43. Kim SW, Haendiges J, Keller EN, 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):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0197053
 44. Wang H, Luo L, Zhang Z, et al. Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases. *Front Med.* 2018;12(1):104-112. doi:10.1007/s11684-

- 017-0593-9
45. Lepe JA, Torres MJ, Liró J, Luque R, Aznar J. Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30(10):602-607.
 46. Félix B, Feurer C, Mailet A, et al. Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. *Front Microbiol*. 2018;9:684.
 47. Pavón ABI, Maiden MCJ. Multilocus sequence typing. In: *Molecular Epidemiology of Microorganisms*. Springer; 2009:129-140.
 48. Chen Y, Perfect JR. Efficient, Cost-Effective, High-Throughput, Multilocus Sequencing Typing (MLST) Method, NGMLST, and the Analytical Software Program MLSTEZ. In: *Genotyping*. Springer; 2017:197-202.
 49. Maury MM, Tsai Y-H, Charlier C, et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat Genet*. 2016;48(3):308.
 50. Hilliard A, Leong D, O'Callaghan A, et al. Genomic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates associated with clinical listeriosis and the food production environment in Ireland. *Genes (Basel)*. 2018;9(3). doi:10.3390/genes9030171
 51. Ricci A, Allende A, Bolton D, et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J*. 2018;16(1). doi:10.2903/j.efsa.2018.5134
 52. Nielsen EM, Björkman JT, Kiil K, et al. Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. *EFSA Support Publ*. 2017;14(2):1151E.
 53. Dhama K, Karthik K, Tiwari R, et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Vet Q*. 2015;35(4):211-235.
 54. Oordt-Speets AM, Bolijn R, Van Hoorn RC, Bhavsar A, Kyaw MH. Global etiology of bacterial meningitis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;13(6):1-16. doi:10.1371/journal.pone.0198772
 55. Schlech III WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, et al. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J Med*. 1983;308(4):203-206.

56. Le Monnier A, Join-Lambert OF, Jaubert F, Berche P, Kayal S. Invasion of the placenta during murine listeriosis. *Infect Immun*. 2006;74(1):663-672.
57. Todd ECD, Notermans S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2011;22(9):1484-1490.
58. Goulet V, King LA, Vaillant V, de Valk H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis*. 2013;13(1). doi:10.1186/1471-2334-13-11
59. Dreyer M, Aguilar-Bultet L, Rupp S, et al. *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant rhombencephalitis. *Sci Rep*. 2016;6(1):1-11.
60. Stear MJ. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) 5th Edn. Volumes 1 & 2. World Organization for Animal Health 2004. ISBN 92 9044 622 6.€ 140. *Parasitology*. 2005;130(6):727.
61. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J*. 1997;153(1):9-29.
62. Rodriguez C, Taminiau B, García-Fuentes E, Daube G, Korsak N. *Listeria monocytogenes* dissemination in farming and primary production: Sources, shedding and control measures. *Food Control*. Published online 2020:107540.
63. Bortolussi R. Listeriosis: a primer. *Cmaj*. 2008;179(8):795-797.
64. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Engl J Med*. 1988;319(13):823-828.
65. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. 2007;9(10):1236-1243. doi:10.1016/j.micinf.2007.05.011
66. Castañeda-ruelas G, C D, Eslava-campos C, C D, Campo NC, C D. ENSAYO Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*. 2014;56(6):654-659.
67. Centre for Enteric Diseases and Division of Public Health Surveillance and Response. Situation report on listeriosis Outbreak, South Africa, 2018. 2018;1-3. http://www.nicd.ac.za/wp-content/uploads/2018/03/Listeria-Sitrep-13Mar2018_finalapproved.pdf
68. Chen M, Cheng J, Wu Q, et al. Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh aquatic products in China. *Front Microbiol*. 2018;9:1-11. doi:10.3389/fmicb.2018.02215
69. Murugesan L, Kucerova Z, Knabel SJ, Laborde LF. Predominance and distribution of a persistent *Listeria monocytogenes* clone in a commercial fresh

- mushroom processing environment. *J Food Prot.* 2015;78(11):1988-1998.
doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-195
70. Vallim DC, Barroso Hofer C, Lisbôa RDC, et al. Twenty Years of Listeria in Brazil: Occurrence of Listeria Species and Listeria monocytogenes Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. *Biomed Res Int.* 2015;2015.
doi:10.1155/2015/540204
71. 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. *Pesqui Vet Bras.* 2016;36(10):957-964.
doi:10.1590/S0100-736X2016001000007
72. Almeida RM de, Barbosa AV, Lisbôa R de C, et al. Virulence genes and genetic relationship of L. monocytogenes isolated from human and food sources in Brazil. *Brazilian J Infect Dis.* 2017;21(3):282-289.
doi:10.1016/j.bjid.2017.01.004
73. da Silva WP, de Lima AS, Gandra EÁ, de Araújo MR, de Macedo MRP, Duval EH. Listeria spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural.* 2004;34(3):911-916.
74. Brasil. Ministério da Agricultura P e A. Instrução Normativa nº 9 de 08/04/2009. Institui os procedimentos de controle da Listeria monocytogenes em produtos de origem animal. Published 2009. Accessed November 18, 2019.
<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/listeria-monocytogenes>
75. Brasil. Ministério da Agricultura P e A. Norma Interna DIPOA/SDA nº1, de 09/08/2013. Published 2013. Accessed November 26, 2020.
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/norma_interna_dipoa_01_2013_listeria-1.pdf/@@download/file/norma_interna_dipoa_01_2013_listeria-1.pdf
76. Pinto FGS, Souza M, Saling S, Moura AC. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. *Arq Inst Biol.* 2011;78(2):191-198.
77. Hofer E, Falavina Dos Reis CM, Hofer CB. Serovars of Listeria monocytogenes and related species isolated from human clinical specimens. *Rev Soc Bras*

- Med Trop.* 2006;39(1):32-37.
78. Rodrigues CS, Sá CVGC de, Melo CB de. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural.* 2017;47(2).
 79. Silva HR, Gianoglou FM, Campos MF, Graciano EMA, Toledo RCC. Listeriose: uma doença de origem alimentar pouco conhecida no Brasil. *Hig alim.* Published online 2016:17-20.
 80. Caselani K, Prata LF, Bizari PA, Pereira GT, de MARCHI PGF, Picinato MA de C. Ocorrência de *Listeria* spp. e de *Listeria monocytogenes*, em um matadouro-frigorífico de bovinos do Estado de São Paulo. *Biosci J.* Published online 2013:956-961.
 81. International Organization for Standardization. ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method. Published 2017. Accessed November 26, 2020. <https://www.iso.org/standard/60313.html>
 82. Gonçalves M, Furtado R, Coelho A, Correia CB, Valente A. Presença de *Listeria monocytogenes* em queijos de pasta mole da região a sul do Tejo. *Port J Public Heal.* 2017;35(1):37-43.
 83. Doumith M, Cazalet C, Simoes N, et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect Immun.* 2004;72(2):1072-1083.
 84. Arslan S, Özdemir F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species, and virulence genes, serotyping, PCR-RFLP and PFGE typing of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods. *FEMS Microbiol Lett.* Published online 2020.

ANEXO I – Artigo de revisão formatado para ser submetido à revista *Journal of Veterinary Science (J Vet Sci)*

***Listeria monocytogenes*: serotypes, lineages, clonal complexes and epidemic clones from clinical cases, food products and food processing environments and their implications for global public health**

Running title: Genetic patterns of *Listeria monocytogenes* in food and FPEs

Ana Beatriz Carollo Rocha Lima^{1,2}, Vanessa Louise Abduch Fabrega³, Alex de Camargo Coque², Edna Cristiane da Matta², Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha^{2*}

1– Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), Jundiaí-SP, Brasil.

2 – Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo-SP, Brasil.

3 – Setor de Internacionalização Acadêmica, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo-SP, Brasil.

***Corresponding author:** Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha

Graduate Program in Environmental and Experimental Pathology, Paulista University (UNIP).

Avenida José Maria Whitaker 290, CEP 04057–000, São Paulo, SP, Brasil.

55 (11) 5586-4000

E-mail: ricardodellarmeline@gmail.com

Funding: This work was supported by a doctoral scholarship from Universidade Paulista (UNIP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is considered pathogenic and of importance in human and veterinary medicine. Outbreaks of listeriosis in humans have been linked to contaminated animal and vegetable subproducts, as well as fruits and industrial products, chilled and ready-to-eat food for consumption. Studies have shown that, in general, these outbreaks of listeriosis are caused by a small number of strains that are closely related genetically, suggesting that they belong to a group of well-defined clones, implicated in different, geographically and temporarily unrelated epidemics, called epidemic clones (ECs). The largest outbreaks of fatal human listeriosis worldwide have been related to ECs or globally widespread clonal complexes (CCs), since the most prevalent CCs correspond to ECs associated with major outbreaks. The process of subtyping is important epidemiologically to recognize outbreaks of the disease, detection of cross-transmission of nosocomial pathogens, determination of the origin of the infection and recognition of particularly virulent strains. The investigation of the epidemiology and virulence factors of *L. monocytogenes* by molecular methods are essential, since they will help to elucidate the ecology, evolution and characterization of the strains of this microorganism, thus bringing better strategies for the control and prevention of food-borne listeriosis. This review summarizes the latest updates in the understanding of *Listeria* distribution patterns throughout the world. We discuss how these data are important, especially for surveillance programs useful for Public Institutions at a worldwide level.

Keywords: Listeriosis; clonal complex, epidemic clones; molecular epidemiology; MLST.

INTRODUCTION

Listeria genus has seventeen species described. The main species associated with disease in mammals are *L. monocytogenes* and *L. ivanovii*¹. *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* are considered pathogenic and are important in human and veterinary medicine. *L. ivanovii* has been described as pathogenic primarily to animals, with ruminants being the most frequently affected species, mainly goats and sheeps. There are reports of *L. ivanovii* associated with bacteremia and gastroenteritis in humans, but with a rare occurrence when compared to *L. monocytogenes*².

Although *L. innocua* is not considered a pathogenic bacterium³, recent studies indicates that it may have resistance genes to several antimicrobials^{4,5}, so that it can form a reservoir of resistance genes capable of being transferred between bacterial species, including those capable of causing disease in humans⁴. One study described the first case of cerebral listeriosis in a bull due to *L. innocua*⁶ and another study described the occurrence of sublethal lesions experimentally in animal models due to the same bacterium⁷.

Listeria monocytogenes is a Gram-positive mobile cocobacillus, uniform in shape, non-capsule-forming, with rounded edges and small size (0.4 to 0.5 × 0.5 to 2µm). It is a facultative anaerobic bacterium, flagellated, nonsporulating and not forming capsules^{1,8}. It can be found isolated or in small chains or can be arranged in a V or Y shape or palisade (side by side)⁹. *Listeria monocytogenes* has peritrichic flagella, which allows motility when cultivated between 20°C and 25°C and is motionless or has poor motility at 37°C¹⁰, unlike *L. innocua*⁹. *Listeria monocytogenes* has the ability to adapt and survive in extreme conditions: grows in a wide pH range (4.3-9.6), temperature (0°C to 45°C, with optimum growth range between 30°C to 37°C) and at higher salt concentrations (10% a >20%)¹¹. This microorganism supports repeated freezing and thawing¹² but is sensitive to pasteurization¹⁰.

Distinct subtypes of *L. monocytogenes* can survive and adapt to various stressors, such as low temperature, osmotic pressure, low pH and sublethal concentrations of biocides ¹³.

Listeria monocytogenes is a ubiquitous bacterium and can be isolated from water, soil, sewage, vegetation (pasture, silage), vegetables, animal feces, food production environments (FPEs) and in different foods such as raw and pasteurized milk, cheeses, sausages, beef, pork, poultry, fish, products of plant origin, marine origin and ready-to-eat foods ^{8,12,14,15}. The bacteria can also be found in the gastrointestinal tract of healthy men: studies suggest that 1- 10% of humans may be carriers of *Listeria* ¹⁶.

Asymptomatic carriers, as well as environmental sources, can lead to contamination of water and food and the consequent infection of animals, being very common the contamination of the carcass and cuts of meat during slaughter in FPEs, as well as during the inadequate processing of food ^{15,17,18}. Studies indicated the ability of *L. monocytogenes* to form biofilm ¹⁹⁻²¹, the susceptibility of some strains to several antimicrobials ²²⁻²⁵ and the presence of genes associated with virulence, stress and resistance ^{26,27}.

Unlike other foodborne diseases such as salmonellosis, listeriosis has a long incubation period (3 to 70 days), which is sometimes difficult to specify, since *L. monocytogenes* can contaminate a wide variety of foods, and since products contaminated by *L. monocytogenes* are products that can be kept for several days, weeks or months, they can be consumed by the patient on several occasions. Thus, products consumed over a long period (usually 30 days) are considered suspect ²⁸. These factors make it difficult to identify the sources of infection, as these may be present at the beginning of the food production chain ^{18,29}, in food storage ^{9,30} or in ready-to-eat foods ^{29,31}.

Listeria monocytogenes can affect several species of mammals (mainly ruminants), generating an adverse economic impact on the production. In addition, farm animals can become a source of infection for man, mainly by consuming contaminated animal products

^{22,28,32,33}. Additionally, birds are subclinical carriers of the microorganism, as well as fish and crustaceans ³⁴. Contaminated silage is a common source of infection with *L. monocytogenes* for farm animals, which can become sick (silage disease) or become asymptomatic carriers and eliminate the bacteria in feces and milk ¹⁰.

There are some factors that can favor human infection, such as the use of antacids, pH blocking agents, and ulcer surgery. The invasion of tissues by *L. monocytogenes* may increase in cases of gastrointestinal infection by another pathogen. Other horizontal transmission routes for *L. monocytogenes* are direct skin contact, indirect contact with contaminated sources, such as urine, feces, and airway. Vertical transmission, on the other hand, can occur through intercourse, with contact with urogenital secretions or through blood ¹⁵. Listeriosis is a severe disease, and it is a zoonosis with low incidence, but it represents a major risk to public health due to the severity of the consequences, presenting high lethality (20% to 30%)

²⁸.

Serotypes and lineages

To date, 15 serotypes of *L. monocytogenes* are known: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b and 7. *O* and *H* antigens are used for serological detection with corresponding antibodies. Serotypes of Listeria strains can be determined by their unique combinations of their 15 *O* somatic antigens (namely I-XV) and 4 *H* flagellar antigens (namely A-D) ³⁵. Table 1 shows the correspondence between the main serotypes and lineages of *L. monocytogenes*.

Table 1: Correspondence between the main serotypes and lineages of *L. monocytogenes*

Serotypes	Lineages
1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e	Lineage I
1/2a, 1/2c, 3a, 3c	Lineage II
4a, 4c	Lineage III
4a, 4b, 4c atypicals	Lineage IV

Source: Chen et al. 2017³⁵; Lomonaco et al. 2015³⁶.

Historically, lineage I has been isolated in cases of human listeriosis, as well as the production of dairy and meat foods, among other sources. This lineage groups together the strains involved in major outbreaks of listeriosis, both human and animal, suggested as important for public health^{30,37–41}. The serotypes of lineage II are common in food, and it is hypothesized that they are widespread in natural and rural environments. However, lineage II samples have also been commonly isolated from cases of listeriosis in animals and sporadic human clinical cases^{27,42–45}.

A limited subset of clones (mainly belonging to serotypes 1/2a, 1/2b and 4b) is responsible for most of the clinical cases recorded worldwide³⁶. Serotypes 1/2a, 1/2b and 4b are responsible for 98% of documented cases, while serotypes 4a and 4c are rarely associated with disease outbreaks. Serotype 4b samples are the most associated with listeriosis outbreaks, while serotypes 1/2a and 1/2b have been associated with sporadic infections by *L. monocytogenes*³⁵. Serotypes 4b, 1/2b and 1/2a are the most frequently associated with infections and disease in humans (90%)^{40,41}, with serotype 4b being identified in 50% of cases⁴⁶.

In 1985 there was an outbreak of human listeriosis in California totaling 142 cases and 48 deaths due to consumption of Mexican-style cheese contaminated with *L. monocytogenes* serotype 4b³¹; later, this outbreak was related to the use of raw cow's milk³². In 1998, Jawetz et al. found serotype 4b that was responsible for a listeriosis outbreak associated with pasteurized milk cheese produced with inappropriately³⁰.

In Poland, between 2014 and 2016, 301 samples of fresh and smoked fish were studied for *L. monocytogenes*, and 18% of the samples were contaminated. Among the four serotypes identified, the most prevalent was serotype 1/2a-3a, followed by serotype 1/2b-3b-7. The high prevalence of *L. monocytogenes* identified in this study emphasizes the importance of fresh and smoked fish as a potential vehicle for transmission of this microorganism and the consequent concern for public health ⁴⁷.

One study provided a bacteriological and molecular characterization of 100 samples of *L. monocytogenes* isolated from humans and food products, from various regions of Brazil, collected between 1975 and 2013. The antigenic characterization defined 49% of the samples identified with serotype 4b, 28% of serotype 1 / 2b, 14% of serotype 1 / 2c, 8% of serotype 1 / 2a and 1% of serotype 3b, reinforcing a prevalence of serotype 4b also in Brazil ³⁸.

Molecular characterization

Molecular epidemiology is the use of molecular biology to study the distribution and determinants of infectious disease ⁴⁸. The combination of phenotypic and genotypic subtyping methods of isolated samples has proved highly effective in the investigation of listeriosis outbreaks ⁴⁹.

Due to the genetic variability of *L. monocytogenes*, techniques were developed for more specific characterization of laboratory isolates. Currently, the gold standard subtyping method, certified by *Center of Disease Control* (CDC) to investigate the molecular epidemiology of foodborne pathogens (including *L. monocytogenes*) is pulsed field gel electrophoresis (PFGE). PFGE is a molecular typing method used in epidemiological studies, which separates large fragments of DNA that cannot be separated by conventional gel electrophoresis. PFGE is an important typification technique due to its high epidemiological agreement, high discriminatory power, and reproducibility ⁴⁹. However, PFGE presents as

limiting factors the high cost of equipment, analysis software and consumables, as well as the need for specialized labor and the fact of having a lower reproducibility when compared to other genotypic methodologies^{50,51}. Due to the limitations of PFGE, the *Multilocus Sequence Typing* (MLST) genotypic method has become the most widely used method to genotype many biological species. MLST can be used to identify the main phylogenetic clades, molecular groups, or subpopulations of a species, as well as strains, individual clones or clonal complexes (CCs). It is a tool for epidemiological analysis and surveillance of pathogens, as well as to investigating its structure and evolution^{14,52}. The method is used to characterize *L. monocytogenes* through primer sequences to search for bacterial metabolism genes, performing the sequencing fragments housekeeping genes of the bacterium, being highly discriminatory. A great advantage of this method is its ability to detect changes in DNA that are not evident by phenotypic approaches, such as serotyping. Moreover, it is a technique that can be readily reproduced and does not require access to reagents or specialized training⁵³.

MLST provides a portable and standardized nomenclature, based on the nucleotide sequence of seven housekeeping genes, with classification of strains by (i) sequence types (STs), defined as the unique allele association of the seven housekeeping genes, and (ii) CCs, defined as a cluster of STs sharing at least six alleles^{53,54}. The data generated are fully portable between laboratories and can be shared across the world via the Internet. Modern methods of direct nucleotide sequencing based on polymerase chain reaction (PCR), such as MLST, do not require direct access to live bacterial isolates or high-quality genomic DNA. The techniques can be performed on dead cell suspensions, avoiding all the difficulties associated with transportation and handling of pathogens, or in clinical samples, such as cerebrospinal fluid or blood from a patient undergoing antibiotic therapy, from which a live bacterial isolate can be difficult to obtain⁵⁵.

The Multi-Locus Virulence Sequence Typing (MvLST) method was developed by Zhang *et al.* (2004), based only on virulence gene sequences. Epidemic clones (ECs) are defined by the MvLST reference method, that evaluates primer sequences to search for virulence genes in bacterial metabolism (for example, prfA, internalin A and B; listeriolysin O and actA), analyzing six to eight genes associated with virulence⁵⁶. MvLST does not need to be combined with other subtyping methods to provide accurate information on ECs, serotypes, and strains of *L. monocytogenes*^{50,56,57}. In addition, the MvLST correctly identifies all ECs of *L. monocytogenes* and has high discriminatory power, epidemiological agreement, stability, and reproducibility^{50,56,58,59}.

Epidemiologia molecular – subtípagem de *Listeria monocytogenes*

Studies have shown that, in general, outbreaks of listeriosis are caused by a small number of closely related strains genetically, suggesting that they belong to a group of well-defined clones (ECs), implicated in different epidemics, geographically and temporarily unrelated^{48,60}. Through genotypic characterization techniques, several outbreaks of listeriosis were subsequently investigated and the relationship of these outbreaks with CCs or CEs was found. The biggest outbreaks of fatal human listeriosis worldwide have been linked to ECs⁴⁹, and the involvement of the same EC in multiple outbreaks suggests that these samples have a reservoir³⁶.

The most prevalent CCs correspond to ECs associated with major outbreaks and have complete virulence prerequisites²⁶. The main ECs^{36,48} and their correspondence to the CCs and serotypes are described in table 2.

Table 2: Correspondence of the most prevalent serotypes of *L. monocytogenes* to their respective CCs and CEs

	Lineage	Serotype	CC	CE
I		4b	CC1	ECI
			CC2	ECIV
			CC4	ECX
		CC6	ECII	
			CC3	ECVIII
			CC5	ECVI
II	1/2a	CC7	ECVII	
		CC8	ECV	
		CC11		
		CC14	ECIII	

Source: Lomonaco et al. 2015³⁶; Wagner, McLauchlin, 2008⁴⁸.

Molecular epidemiology - History of Listeria in the world

The first diagnosis of listeriosis in humans was done in a soldier with meningitis at the end of the 1st World War. Although *L. monocytogenes* has been recognized as an animal pathogen for more than 80 years, the first outbreak confirming an indirect transmission from animals to humans have been reported only in 1983 in the Canada's Maritime provinces. In this outbreak, cabbages, stored in the cold during winter, were contaminated with *L. monocytogenes* through exposure to infected sheep manure^{9,32}.

In North America and Europe during the 80's, there were several outbreaks of human listeriosis. A subsequent listeriosis outbreak in California due to the Mexican-style cheese consumption in 1985 was crucial to become *L. monocytogenes* a high priority pathogen³¹. Since then, *L. monocytogenes* has been implicated in many outbreaks of foodborne illnesses, most commonly resulting from exposure to contaminated dairy products and meat-based products, including hot dogs, fish, and seafood^{61,62}. At the end of the 80s, several outbreaks of listeriosis related to dairy products were reported worldwide⁶³ and researchers, mainly from Central Europe, began to study listeriosis as a food-borne disease¹⁵.

In 2007 it was reported 1,558 cases of listeriosis in 27 countries in Europe, with overall mortality rate of 20% and mortality in the elderly 67%^{28,64}. Despite this, Listeriosis surveillance in the European Union / European Economic Area (EU/EEA) focuses on serious invasive forms of the disease, for which the risk groups are mainly elderly, immunocompromised people, pregnant women, and babies⁵¹. From 2012 to 2015, 343 notifications of *L. monocytogenes* in food and feed were recorded in the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), which is a system to report food safety problems in the EU. This represents 11.86% of all notifications on pathogenic microorganisms in the EU. The highest notification rates of *L. monocytogenes* were identified in fish, milk, and its derivatives⁶⁵. Control measures have been implemented in Estonia, Denmark, France, and Italy following RASFF notifications regarding the prolonged outbreak of listeriosis due to the consumption of smoked fish in five EU countries⁶⁶.

In the USA in 2010, there were 1,662 cases of listeriosis, with a hospitalization rate of 91% and a mortality rate of 16%⁶⁴, although the country has had a DTA monitoring division for more than 30 years (Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases – DFWED)⁶⁷.

The largest outbreak of listeriosis described to date has occurred in South Africa⁶⁸. In the period from June 2017 to April 2018, 937 laboratory confirmed cases were identified. Among 728 patients with a known outcome, 193 (27%) died. (27% mortality rate). The cause of the outbreak was identified as processed meat products ready for consumption. Clinical isolates from 609 patients were sequenced, and 567 (93%) were identified as sequence type 6 (ST6)⁶⁹. Listeriosis was included in the list of notifiable diseases in South Africa⁶⁸.

In Asia, several studies have also performed the isolation of *L. monocytogenes* in food products and obtained isolates related to clinical cases^{29,70,71}. In China, *L. monocytogenes* was isolated from 16.2% of samples from ready-to-eat stores and restaurants of mutton²⁹ and

fresh aquatic products (molluscs, crustaceans and fish) obtained from commercial establishments, and 31.5% of the isolates belonged to ECs ⁷⁰. Many cases of listeriosis were reported in many parts of China over the past 47 years, with a high rate of mortality, similar to what occurs in other countries ⁷². The national microbiological food safety surveillance network in China was established in 2010, including the surveillance of *L. monocytogenes* in different food categories, and the national foodborne disease surveillance system was established in 2011. However, listeriosis is not yet a notifiable disease in China. The first work on the surveillance of human listeriosis in China were published in 2013, and a total of 133 cases of listeriosis have been reported so far ⁷³.

The highest prevalence of foodborne listeriosis infection is related to the socioeconomic classes with the highest purchasing power, due to the consumption of processed foods ¹⁵, and most outbreaks of listeriosis have occurred in Europe, the USA and Canada, that is, in temperate climates; lower prevalence is observed in Australia and New Zealand ⁷⁴. Still, the OzFoodNet was established in Australia in 2000 to improve surveillance of foodborne illness. From 2010, the OzFoodNet enhanced national surveillance of listeriosis and gathering additional data on invasive isolates of *L. monocytogenes*, incorporating data molecular subtyping ⁷⁵.

There are few reported cases of listeriosis in Brazil, but the pathogen has been isolated from dairy products and FPEs. Listeriosis is not a compulsorily notifiable disease in Brazil. Thus, there is still a need for continuous surveillance of this pathogen in the representative dairy industry in Brazil ^{76,77}. In Chile, there was an increase in cases of listeriosis reported in 2008 and 2009 and, after the epidemiological and laboratory investigation, the foods involved were identified, a fact that determined several actions among them: withdrawal of food and control measures ⁷⁸.

The long-term monitoring data analysis in several countries have shown that raw and processed food products may be contaminated with *L. monocytogenes* at different stages of production^{15,17,18}, and that some food categories such as dairy products, meat products and ready-to-eat products are more often contaminated²⁷. Therefore, listeriosis outbreaks in humans have been related to ready-made foods or their production environment and the same CCs identified in these environments are responsible for clinical cases in different locations, as shown in table 3.

Table 3: Global distribution and sample origin of the most prevalent *L. monocytogenes* CCs

Lineage	Serotype	CC	STs	Origin	Ocurrence
I	4b	CC2	ST2, ST48, ST145, ST259, ST1168	Food production	Africa, Europe, South America
			ST2, ST145, ST246, ST276	Food	Africa, Asia, Europe, Middle East, North America, South America
			ST2, ST145, ST244, ST245, ST247, ST257, ST272, ST277, ST290, ST291	Clinical	Africa, Asia, Europe, Middle East, North America, South America, Oceania
I	4b	CC1	ST1, ST73, ST252, ST258, ST515, ST1001	Food production	Europe, North America, South America
			ST1, ST10, ST119, ST248, ST308	Food	Africa, Asia, Europe, North America, South America, Oceania
			ST1, ST73, ST79, ST119, ST248, ST252, ST256, ST278	Clinical	Africa, Asia, Central America, Europe, Middle East, North America
II	1/2c	CC9	ST9	Food production	Europe, South America
			ST9, ST115	Food	Asia, Europe, South America
			ST9, ST122, ST223	Clinical	Africa, Asia, Europe, South America, Oceania
I	1/2b	CC3	ST3, ST235	Food production	Europe, North America, South America
			ST3, ST66, ST68, ST117, ST225, ST228, ST280, ST281, ST287	Food	Africa, Asia, Europe, Middle East, South America
			ST3, ST41, ST117, ST228, ST273, ST778	Clinical	Africa, Asia, Europe, Oceania
II	1/2a	CC8	ST8, ST16, ST120	Food production	Europe, North America
			ST8, ST289, ST1247	Food	Asia, Europe, South America
			ST8, ST120, ST232, ST551, ST1247	Clinical	Africa, Asia, Europe, South America, Oceania
II	1/2a	CC121	ST121	Food production	Europe, South America
			ST121, ST236, ST275	Food	Africa, Asia, Europe, Middle East, South America
			ST121	Clinical	Asia, Europe

II	1/2a	CC7	ST7, ST227	Food production	Europe, Middle East, North America
			ST7, ST12, ST231	Food	Asia, Europe, Middle East, South America
			ST7, ST98	Clinical	Asia, Europe, North America, South America
I	1/2b	CC59	ST59	Food production	Europe, North America
			ST282 ST286 ST59	Food	Africa, Asia, Europe, South America
			ST241 ST59	Clinical	Asia, Europe, Oceania
II	1/2a	CC155	ST239	Food production	Europe
			ST155	Food	Asia, Europe, South America
			ST155, ST237, ST381, ST705	Clinical	Asia, Europe, Oceania, South America
I	1/2b	CC5	ST5	Food production	Europe, North America
				Food	Asia, Europe, South America
				Clinical	Asia, Europe, South America
I	1/2b	CC87	ST87	Food production	Europe, North America
			ST87, ST310, ST1166	Food	Asia, Europe, South America
			ST87, ST310	Clinical	Asia, Europe
II	1/2a	CC101	ST143, ST431	Food production	Europe
			ST101	Food	Africa, Asia, Europe
			ST101, ST113, ST431	Clinical	Asia, Europe, North America
I	4b	CC6	ST6, ST254	Food production	Europe, North America, South America
			ST6, ST1207, ST1395	Food	Europe, South America
			ST6	Clinical	Asia, Europe
II	1/2a	CC37	ST37, ST234	Food production	Europe, North America

			ST37	Food	Asia, Europe
			ST37	Clinical	Europe, South America
II	1/2a	CC14	ST360	Food production	North America
			ST14, ST91, ST160	Food	Asia, Europe
			ST91	Clinical	Asia, Europe
I	1/2b	CC288	ST288, ST324	Food production	Europe, North America, South America
			ST233, ST288, ST330	Food	Asia, Europe, North America
			ST288, ST330	Clinical	Asia, Europe
I	4b	CC4	ST4, ST219	Food production	Europe, North America
			ST4	Food	Europe
			ST4, ST242, ST251	Clinical	Europe
II	1/2a	CC199	ST199	Food production	Europe, North America
			ST199, ST230, ST283	Food	Asia, Europe, South America
			ST199	Clinical	Europa
II	1/2a	CC20	ST20	Food	Asia, Europe
			ST20	Clinical	Europe

Fonte: Papić et al. 2019 ¹⁸; Chen et al. 2018 ²³; Kuch et al. 2018 ²⁵; Muhterem-Uyar et al. 2018 ²⁶; Maury et al. 2019 ²⁷; Wang et al. 2018 ²⁹; Toledo et al. 2018 ⁴⁴; Hurley et al. 2019 ⁴⁵; Kim et al. 2018 ⁵³; Rychli et al. 2018 ⁶⁵; EFSA, 2019 ⁶⁶; Chen et al. 2018 ⁷⁰; Huang et al. 2015 ⁷¹; Oxaran et al. 2017 ⁷⁶; Hilliard et al. 2018 ⁷⁹; Melero et al. 2019 ⁸⁰; Chenal-Francisque et al. 2011 ⁸¹; Althaus et al. 2014 ⁸²; Zhang et al. 2019 ⁸³; Melero et al. 2019 ⁸⁴; Zhang et al. 2019 ⁸⁵.

From the analysis of these data, it is possible to observe that the vast majority of CCs and STs isolated from humans in clinical cases were also isolated in FPEs and ready-made foods, reinforcing the existing relationship between food production and consumption and outbreaks of listeriosis. In France, it has already demonstrated a relationship between the frequency of clones in dairy products and clinical samples ²⁷, and Ireland found that isolates that caused clinical disease are similar to those found in foods or FPES ⁷⁹. These data reinforce the epidemiological importance of *L. monocytogenes* CCs present in dairy products for public health.

A recent study found a positive association between subclinical mastitis in dairy cattle associated with hypervirulent *L. monocytogenes* CCs, suggesting an epidemiological relationship between isolates of subclinical mastitis and different sources such as water and silage, and suggesting subclinical mastitis in cows infected with *L. monocytogenes* as a potential source of contamination of the entire milk production chain and their derivatives ¹⁸. Another study of 2019 showed that the silicone teats of milking contaminated with *L. monocytogenes* can contribute to transmission of *L. monocytogenes* in the herd. The same study found that strains isolated from milk formed a significantly stronger biofilm, while strains with more virulence genes were resistant to a greater number of antibiotics and also formed a stronger biofilm. The results of this study indicate the need to monitor the occurrence of biofilms of *L. monocytogenes* in dairy FPES ²⁴.

The lack of hygienic barriers in specific parts of the facility and the uncontrolled flow of personnel can also be critical factors for the spread of *L. monocytogenes* within and between FPEs buildings: a study carried out on a newly created dairy FPE in Spain has shown that a particular ST was first detected in the third sample and spread throughout the building through the end of the study ⁸⁰. Globalization and the international flow of unregulated foods can also pose a danger to the global distribution of ECs and CCs and STs, as a recent study

characterized the diversity of genotypes of 57 isolates of *L. monocytogenes*, which were derived from 1474 food products illegally imported into the European Union (EU) and identified 16 different types of STs ⁶⁵.

There is a hypothesis that ECs are associated with several outbreaks of human listeriosis possibly due to a better ability to persist in the environment, survive and multiply in food, and not necessarily because they are more virulent ^{27,32,53,81}. As an example, ECI has often been isolated from food of animal origin, possibly indicating that farm animals and the environment related to it can serve as a reservoir, including water, contaminated feed, low- quality silage and cross-contamination in the production of ready-to-eat foods ^{32,36}.

The accessory genomic regions recently described for CCs and ECs have been associated not only with a greater capacity for virulence, but also with a greater resistance to environmental stressors, such as the disinfectants commonly used in FPEs ⁸⁶. In addition, some strains of *L. monocytogenes* showed resistance to heavy metals, such as cadmium and arsenic ^{86,87}. In Ireland, genotyping of *L. monocytogenes* isolates collected from three FPEs identified that 62% of these isolates had genes encoding tolerance to benzalkonium chloride ⁴⁵.

The occurrence of practically identical plasmids in *L. monocytogenes* strains prevalent in different environments and identified in several recent studies includes plasmids among the important factors for the survival of *L. monocytogenes* strains in several FPEs: the presence of almost identical plasmids in different CCs in globally spread serotypes suggest that a high selective pressure acts on these plasmids and they probably provide additional stress response resources for their host strains ²⁶.

The adaptation of clones to different ecological niches and / or to different routes of contamination of food products must be the main factors responsible for the global distribution of the pathogen. The virulence potential of clones may be intrinsically related to their adaptation potential, since hypervirulent clones colonize the intestinal lumen better and

invade more intestinal tissues than hypovirulent ones, whereas hypovirulent clones are adapted to FPEs and have a higher prevalence of resistance genes to stress and tolerance to disinfectants, as well as a greater capacity for survival and biofilm formation in the presence of sub-lethal concentrations of disinfectants such as benzalkonium chloride. Thus, the heterogeneity of virulence reflects the diversity of ecological niches in which the pathogen prevails ^{27,88}.

It is possible to distinguish three distinct patterns among the main *L. monocytogenes* clones: (i) isolated from clinical patients, highly prevalent in dairy products and with low adaptation to FPEs (strain I: CC1, CC2, CC4 and CC6); (ii) isolates associated with food, with low adaptation to the host and high adaptation to FPEs due to the formation of biofilm and tolerance to disinfectants (strain II: CC9 and CC121); and (iii) intermediate isolates, which may be in the process of transitioning from the lifestyle associated with the host to the saprophytic style (CC2 and CC6) ^{27,45}. Although hypervirulent clones have been primarily identified in the lineage I, recent data show that the hypervirulent clones may also be present in the lineage II ⁸⁸.

Some CCs such as CC1, CC2, CC4, CC6 and CC101 are strongly associated with a clinical origin ^{27,79,89,90}. Isolated clinical lines in Ireland belonged to line I or line II, with clones CC1 and CC101 predominating, and clones CC2, CC4 and CC6 were also identified ⁷⁹. Among the isolates of invasive infections of *L. monocytogenes* collected in Poland, the prevalent CCs were CC6 and CC1, belonging to lineage I, followed by CC8 and CC2. The isolates were assigned to nine different SCs, with ECII being the most prevalent ²⁵. In Switzerland, among the clinical isolates investigated, clones CC1 and CC8 also predominated, followed by CC4, CC6 and CC21 ⁸², corroborating the worldwide prevalence pattern. The clinical isolates identified in a clinical study in Chile also belonged predominantly to CC1, although clones that were globally prevalent in clinical cases and foods such as CC2, CC5,

CC7, CC8 and CC9, among others, have also been identified. It is important to highlight that there were two outbreaks of *L. monocytogenes* in 2008 and 2009 in Chile, which were associated with the consumption of soft cheese and sausages / meat products, respectively ⁴⁴. A recent study also identified the presence of hypervirulent *L. monocytogenes* CCs such as CC2, CC4 and CC11 in dairy cattle with subclinical mastitis ¹⁸.

CC1 is highly represented in dairy products and is also hypervirulent ^{27,38,91}, having been associated with several major outbreaks in the USA from 1985 to 2000 ^{87,92}. CC4 is generally prevalent in cases of human listeriosis and is considered neuroinvasive and hypervirulent ⁹⁰. Among the virulence requirements of the lineage I highlights the gene cluster listeriolysin O (LLS), which exhibits bactericidal activity and modifies the microflora of the host during infection ⁹³ and the pathogenicity islands LIPI-III (present in CC1 to CC6) and LIPI-IV (limited to CC4 and ST87), which contribute to neural and placental invasion ^{26,83}.

CC1 / CEI is also highly associated with rhomboencephalitis by *L. monocytogenes* in ruminants ^{27,32,33}, and analysis of faecal samples from cattle and sheep has shown that serotype 4b (which includes CC1) is the most prevalent ³², highlighting the high virulence of this clone for cattle and its presence in agricultural environments. A study of 2013 compared twenty isolated romboencefalite of ruminants confirmed as *L. monocytogenes* in Italy with humans, food and environmental isolates of *L. monocytogenes* and found that 60% of the isolates analyzed belonged to the CIS (including serotype 4b and CC1), which has been epidemiologically linked to several outbreaks of human listeriosis, supporting the hypothesis that ruminants represent possible natural reservoirs of *L. monocytogenes* strains capable of causing outbreaks of listeriosis in humans ³².

Although CC8 isolates are also known to cause listeriosis in China and EU countries ^{29,66,82}, a comprehensive study is needed to elucidate their pathogenicity ⁶⁶. A 2017 study determined the first profile of *L. monocytogenes* in the dairy industry in Brazil and isolated

from FPE a ST2 sequence type, belonging to strain I, responsible for most outbreaks of listeriosis in the world. ST3 and ST8 were found in cheese sold and were also previously associated with outbreaks ⁷⁶.

Hypovirulent CCs such as CC9 and CC121, are associated with meat-based food products and are more often isolated in highly immunocompromised patients ^{27,89,90}. CC9 and CC121 are reported in products that need to be processed before consumption (for example, meat and seafood) and usually harbor tolerance genes that may be related to their survival, growth and persistence in FPEs ²⁷: a study conducted in a SPF chickens in Spain found that ST9 and ST121 were the most prevalent and persistent strains, and boning and processing areas had the highest contamination by *L. monocytogenes* ⁸⁴. Another study characterized the diversity of genotypes of 57 isolates of *L. monocytogenes*, which derived from 1474 food products imported illegally into the European Union (EU) and identified 16 different types of STs, with ST2, ST9 and ST121 being the most prevalent. ⁶⁵. 100 *L. monocytogenes* isolates collected from three FPEs in Ireland were also characterized as CC101, CC9, CC121 and CC5, and 62% of these isolates had tolerance genes for benzalkonium chloride disinfectant ⁴⁵.

Studies conducted in the EU with isolates of *L. monocytogenes* in ready-to-eat foods identified that CC121, CC8 and CC155 were predominantly isolated from fish and fish products, while strains CC31 and CC2 showed a higher prevalence in meat and meat products ^{94,95}. One study compared *L. monocytogenes* CCs from cooked foods in the city of Zigong and 33 cases of listeriosis from different districts in China, and found that CC87, CC9, CC8 and CC3 were the most prevalent in cooked products and CC87 and CC3 were frequent in the 33 strains of clinical origin ²⁹. Another chinese study isolated *L. monocytogenes* from raw and ready-to-eat foods, with ST9 (CC9) predominating among the isolates, followed by ST155 (CC155), ST8 (CC8) and ST121 (CC121); sushi and salmon sashimi were the ready foods with the highest incidence of the pathogen ⁸³. In a study carried out in 43 cities in China with

fresh aquatic products (mollusks, crustaceans and fish) obtained from commercial establishments, approximately 7.92% of the samples were positive for *L. monocytogenes*. Strains belonging to serotypes 1/2a, 1/2b, and 4c, as well as to ST299, ST87 (CC87) and ST8 (CC8) were predominantly isolated, with ST87 and ST8 already being related to outbreaks of listeriosis in China and other countries ⁷⁰. This study also suggested that ST299, ST87 and ST8 are prevalent in aquatic products.

Another Chinese study found that ST8 and ST87 were predominant in approximately 21.20% of the edible mushrooms sampled, indicating that specific STs may have distinct ecological niches ²³. This can apply to ST87 and ST155, since they are the same STs also identified in clinical cases in China: the three STs most common identified in a study were ST8 (CC8), ST5 (CC5) and ST87 (CC87) representing 46.9% of the isolates; ST155 (CC155) was also detected in the study. The predominant STs in other parts of the world were also present in China, such as ST1, ST2 and ST9 ⁸⁵. In Taiwan, the ST most frequently isolated from clinical cases was also ST87, followed by ST378 (CC19) and ST155 ⁷¹, reinforcing the prevalence of CC87 among clinical cases and aquatic products in Asia ²³. A revisional study investigated the contamination of *L. monocytogenes* in various aquatic ecosystems, seafood products and processing environments since the 1990s and found that most aquatic product isolates belong to serotype 1/2a, and outbreaks were associated with highly similar strains ⁹⁶.

The CC5 clone also contaminates a variety of food products and processing environments and/or causes outbreaks. A 2017 study evaluated strains obtained from contaminated ice cream, environmental samples and patients linked to an outbreak of listeriosis in the United States and found that all clinical, food and environmental isolates belonged to serotypes 1/2b, 3b and 7 and strain 1, and that the outbreak was attributed to different strains of ST5 (CC5) ⁹⁷. A genomic analysis of 121 isolates of *L. monocytogenes* recovered from milk, milk filters and milking equipment collected from dairy cattle farms in

19 US states over a 12-year period identified 60 STs of 56 CCs: in lineage I, CC5 and CC1 were among the most abundant, and in lineage II, CC7 and CC37 were the most abundant and predominated among the isolates obtained in the study. In the MvLST analysis, 59 virulence types (VTs) were identified, of which 25% belonged to CEs I, II, V, VI, VII, VIII, IX or X and 31 were new VTs. Several of the isolated CCs have previously been associated with central nervous system infections and maternal and neonatal infections, and some strains were like strains isolated from previous outbreaks unrelated to dairy ⁵³.

A 2011 study provided the first global view of the clonal diversity of *L. monocytogenes*, and the results showed the worldwide distribution and high prevalence of some common clones in different regions of the world. CC1 and CC2 were prevalent in all regions of the world, except in North Africa for CC1. CC3 ranked among the 4 most common clones in all regions, while CC9 ranked third in Europe and the Western Hemisphere. In total, these 4 clones represented 54 (50%) food isolates and 80 (68%) clinical isolates, demonstrating that the same clones represent a large part of *L. monocytogenes* isolates in different regions of the world ⁸¹.

Several studies have also focused on the distribution of CCs and STs in different periods of time and in different geographical regions. A 2018 review identified that historically dominant CCs, such as CC1, CC2 and CC3, have been less prevalent in recent years, while previously uncommon CCs are increasing in prevalence, mainly CC5, CC6, CC8, CC9, CC16, CC37, CC121 e CC204 ⁸⁶.

Another important factor about *L. monocytogenes* is the systematic growth of resistance to antimicrobial agents, observed in a study published in 2019, in which 44.4% of milk isolates and 40.0% of blood isolates from human patients with disease were susceptible to all antibiotics tested (penicillin, ampicillin, meropenem, erythromycin and cotrimoxazole), showing the need to monitor the resistance of *L. monocytogenes* to antimicrobials ²⁴. A recent

study showed that over 95% of *L. monocytogenes* isolated from edible mushrooms were resistant to penicillin, ampicillin, oxacillin and clindamycin, while more than 90% were susceptible to 16 antibiotic agents²³. Another study found antimicrobial susceptibility for 344 isolates of invasive *L. monocytogenes* infections in hospitalized patients, collected between 1997 and 2013 in Poland, and all isolates were susceptible to the 10 antimicrobials tested. It is important to emphasize that the average lethality rate is 40%, and that Poland is the sixth most populous country in the EU, and is also a major supplier of meat and egg products to the EU and outside the EU²⁵. These factors are of extreme epidemiological relevance in assessing the risk inherent to the spread of *L. monocytogenes*, with worldwide relevance and applicability, especially for the main food producing countries in the world⁹⁸.

Natural resistance of *L. monocytogenes* to oxacillin and resistance to ciprofloxacin, linezolid, clindamycin, ampicillin and rifampicin were most often reported in genetic lineages of lineage I. The induction of resistance by sublethal exposure to stress by low concentration and heavy metals is credible²⁶. Accessory genomic regions recently described in *L. monocytogenes* strains have been associated with greater virulence capacity, as well as greater resistance to environmental stressors, such as disinfectants commonly used in FPEs. In addition, the genes involved in stress tolerance generally have multiple overlapping functions, thus achieving a tolerance response to various stresses⁸⁶.

A study carried out in FPEs in Austria followed the internal evolution of *L. monocytogenes* genotypes collected from a heavily contaminated FPE and detected at the beginning of the sampling a wide variety of *L. monocytogenes* STs, predominantly ST1, ST21 and ST87, which did not have plasmids. . After intensification of hygiene measures, the variability was reduced almost entirely for *L. monocytogenes* ST5, which predominated in the following two years and whose plasmids harbored a resistance system to heavy metals, possibly providing a greater tolerance to disinfectants²⁶.

The relationship between clinical cases of listeriosis to contaminated foods is evident, and dairy products have repeatedly proven to be the main source of *L. monocytogenes*. Despite this, the characteristics of *L. monocytogenes* strains isolated from unpasteurized milk and dairy farms, the diversity and virulence profiles of *L. monocytogenes* isolates and the sources of introduction of these CCs into the food supply chain are not yet fully understood ^{24,27,53,54,81}. Changes in production and distribution of food may have contributed to the greater adaptability of *L. monocytogenes* in different environments ⁹⁹. However, due to the few existing records in this regard, as well as the lack of standardization of genotyping, still lack studies on the characterization of *L. monocytogenes* with standards and methodologies for genotyping with high reproducibility for bacterial characterization ^{27,81}.

In the last decade, an increasing number of events has been associated with food not traditionally recognized as vehicles for Listeria transmission, and an increase in international events was observed. It is recommended to inform high-risk individuals such as pregnant women and immunocompromised individuals on safe practices for food handling, particularly in places where the surveillance of foodborne diseases is weak or non-existent ⁹⁹.

CONCLUDING REMARKS

Among the many factors that contribute to global distribution patterns of *L. monocytogenes* we can mention the increasing number of people, the existence of vulnerable or more exposed population groups, the process of disordered urbanization and the consequent need for food production on a large scale, the change in eating habits and the spread of culture associated with the consumption of food intended for collective ready consumption (fast-foods), the consumption of food on public roads, the use of new types of production, the increase in the use of additives and even environmental changes, globalization and population displacement current facilities around the world ³⁸.

The investigation of incidence of *L. monocytogenes* is necessary and fundamental to establish the relationship between the type of food consumed and the occurrence of the bacterium in clinical samples, in addition to enabling the determination of its importance as an infectious agent, the control and prevention of listeriosis outbreaks of food origin in the population ⁴². The presence of *L. monocytogenes* in equipment and utensils in the FPEs of products of animal origin can represent a serious risk to the population, due to the possibility of incorporation of the bacteria in the final product (cross contamination) ^{9,32,96}.

The eradication of *L. monocytogenes* from food chains is still a major challenge for the food industry and control authorities, since some CCs are better adapted to FPEs or are globally spread ^{24,26,45}. For the genetic characterization of the bacterium, it is necessary to use techniques to differentiate the strains and to identify CCs and CEs, since the combination of genotypic and phenotypic methods has proven to be highly effective in investigating outbreaks of the disease ⁴⁸.

The investigation of the epidemiology and virulence factors of *L. monocytogenes* through molecular methods are essential, as they will assist in elucidating the ecology, evolution and characterization of the strains of this microorganism, thus bringing better control and prevention strategies for food-borne listeriosis ^{27,36,87}. These data can also help to understand how the bacteria circulates between animals, food / feed, humans and the environment and, eventually, help identify food contamination routes, leading to a reduction in food contamination and better prevention of human listeriosis ²⁷.

The cosmopolitan distribution of clones, which protects them from extinction resulting from local disturbances, further highlights the crucial need to standardize the genotyping of *L. monocytogenes* to improve global epidemiological knowledge and monitor current emergency trends. Therefore, to understand the distribution of *L. monocytogenes* CCs in different types

of food remained an essential part to completely unravel the pathogen's biology with respect to adapting to ecological niches ⁹².

This study contributes to the understanding *L. monocytogenes* distribution patterns throughout the world. This information's are especially important for surveillance programs to be implemented in all countries that do not have them.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors have declared that no conflicts of interest exist.

ACKNOWLEDGMENTS

To Post-Graduated Program of Patologia from Universidade Paulista (UNIP) for doctoral scholarship granted.

AUTHOR CONTRIBUTION

Conceptualization: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Data curation: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Formal analysis: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Funding acquisition: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Investigation: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima, Edna Cristiane da Matta, Alex de Camargo Coque; Methodology: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima; Project administration: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Resources: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Supervision: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Validation: Paulo Ricardo Dell'Armeline Rocha; Visualization: Paulo Ricardo Dell'Armeline; Writing - original draft: Vanessa Louise Abduch Fabrega; Writing - review & editing: Ana Beatriz Carollo Rocha Lima.

REFERENCES

1. Phraephaisarn, C. *et al.* A novel biomarker for detection of *Listeria* species in food processing factory. *Food Control* (2017) doi:10.1016/j.foodcont.2016.10.001.
2. Guillet, C. *et al.* Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.* (2010) doi:10.3201/eid1601.091155.
3. Liu, D. Molecular Approaches to the Identification of Pathogenic and Nonpathogenic *Listeriae*. *Microbiol. Insights* (2013) doi:10.4137/mbi.s10880.
4. Gómez, D. *et al.* Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* (2014) doi:10.1016/j.fm.2014.02.017.
5. Escolar, C., Gómez, D., Del Carmen Rota García, M., Conchello, P. & Herrera, A. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. *Foodborne Pathog. Dis.* (2017) doi:10.1089/fpd.2016.2248.
6. Rocha, P. R. D. A. *et al.* Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Res. Vet. Sci.* (2013) doi:10.1016/j.rvsc.2012.07.017.
7. Silva, A. *et al.* Sublethal injury and virulence changes in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* treated with antimicrobials carvacrol and citral. *Food Microbiol.* (2015) doi:10.1016/j.fm.2015.02.016.
8. Murray, P., Rosenthal, K. & Pfalle, M. *Microbiología Médica. Microbiología Médica* (2014).
9. Ryser, E. T. & Marth, E. H. *Listeria, listeriosis, and food safety: Third edition. Listeria, Listeriosis, and Food Safety, Third Edition* (2007).
10. Barancelli, G. V., Silva-Cruz, J. V., Porto, E. & Oliveira, C. A. F. *Listeria Monocytogenes: Ocorrência Em Produtos Lácteos E Suas Implicações Em Saúde Pública. Arq. Inst. Biol. (Sao. Paulo).* (2011).
11. Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 3819–3822 (2004).
12. Franco, B. D. G. de M. & Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos.* (Atheneu, 2008).
13. Melo, J., Andrew, P. W. & Faleiro, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* **67**, 75–90 (2015).
14. Nayaranan, S. *Veterinary Microbiology.* in (eds. McVey, D. S., Kennedy, M. & Chengappa, M. M.) (Wiley-Blackwell, 2013).
15. Pirola, S., Mantilla, S., Franco, R. M. & Trindade, L. A. Importância Da *Listeria Monocytogenes* Em Alimentos De Origem Animal. *Rev. da FZVA* **14**, 180–192 (2007).
16. CFSA. *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook.* in *Bad Bug Book* (ed. Food and Drug Administration) (BrainFeed Press, 2000).
17. Kasnowski, M. C., Valente, A. M., Franco, R. M., Oliveira, L. A. T. & Carvalho, J. C.

- A. *Listeria* spp: um patógeno emergente. 52–57 (2007).
18. Papić, B., Golob, M., Kušar, D., Pate, M. & Zdovc, I. Source tracking on a dairy farm reveals a high occurrence of subclinical mastitis due to hypervirulent *Listeria monocytogenes* clonal complexes. *J. Appl. Microbiol.* **127**, 1349–1361 (2019).
 19. Bolocan, A. S. *et al.* Inhibition of *Listeria monocytogenes* biofilms by bacteriocin-producing bacteria isolated from mushroom substrate. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 279–293 (2017).
 20. Colagiorgi, A. *et al.* *Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry. *Pathogens* **6**, 41 (2017).
 21. Oloketuyi, S. F. & Khan, F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms—Current knowledge and future outlooks. *J. Basic Microbiol.* **57**, 728–743 (2017).
 22. Skowron, K. *et al.* Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **296**, 75–82 (2019).
 23. Chen, M. *et al.* Prevalence, Potential Virulence, and Genetic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolates From Edible Mushrooms in Chinese Markets. *Front. Microbiol.* **9**, 1–12 (2018).
 24. Skowron, K. *et al.* Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission. *Polish J. Microbiol.* **68**, 353–369 (2019).
 25. Kuch, A. *et al.* Molecular diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections in Poland (1997–2013). *Sci. Rep.* **8**, 1–11 (2018).
 26. Muhterem-Uyar, M. *et al.* New aspects on *Listeria monocytogenes* ST5-ECVI predominance in a heavily contaminated cheese processing environment. *Front. Microbiol.* **9**, 1–14 (2018).
 27. Maury, M. M. *et al.* Hypervirulent *Listeria monocytogenes* clones' adaption to mammalian gut accounts for their association with dairy products. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
 28. Goulet, V., King, L. A., Vaillant, V. & de Valk, H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect. Dis.* **13**, (2013).
 29. Wang, H. *et al.* Prevalence and molecular characteristics of *Listeria monocytogenes* in cooked products and its comparison with isolates from listeriosis cases. *Front. Med.* **12**, 104–112 (2018).
 30. Jawetz, E. *et al.* *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, Ed. (1998).
 31. Linnan, M. J. *et al.* Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N. Engl. J. Med.* **319**, 823–828 (1988).
 32. Dell'Armelina Rocha, P. R. *et al.* Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 3059–3066 (2013).
 33. Dreyer, M. *et al.* *Listeria monocytogenes* sequence type 1 is predominant in ruminant

- rhomencephalitis. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
34. Stear, M. J. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees) 5th Edn. Volumes 1 & 2. World Organization for Animal Health 2004. ISBN 92 9044 622 6.€ 140. *Parasitology* **130**, 727 (2005).
 35. Chen, J.-Q., Regan, P., Laksanalamai, P., Healey, S. & Hu, Z. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods and environmental sources. *Food Sci. Hum. Wellness* **6**, 97–120 (2017).
 36. Lomonaco, S., Nucera, D. & Filipello, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect. Genet. Evol.* **35**, 172–183 (2015).
 37. Vallim, D. C. *et al.* Twenty Years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
 38. Almeida, R. M. de *et al.* Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* **21**, 282–289 (2017).
 39. Doumith, M. *et al.* New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* **72**, 1072–1083 (2004).
 40. MORENO, A. M., PAIXÃO, R., MORENO, L. Z. & de GOBBI, D. D. S. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolated from different sources in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci* **50**, 136–144 (2013).
 41. Nyarko, E. B. & Donnelly, C. W. *Listeria monocytogenes*: strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. *J. Food Sci.* **80**, M2868–M2878 (2015).
 42. Cruz, C. D., Martinez, M. B. & Destro, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Aliment. e Nutr. Araraquara* **19**, 195–206 (2009).
 43. Orsi, R. H., den Bakker, H. C. & Wiedmann, M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* **301**, 79–96 (2011).
 44. Toledo, V. *et al.* Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and non-clinical samples in Chile. *Genes (Basel)*. **9**, 396 (2018).
 45. Hurley, D. *et al.* Whole-Genome Sequencing-Based Characterization of 100 *Listeria monocytogenes* Isolates Collected from Food Processing Environments over a Four-Year Period. *mSphere* **4**, 1–14 (2019).
 46. McLauchlin, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**, 210–213 (1990).
 47. Wiczorek, K. & Osek, J. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh and smoked fish in Poland. *Food Microbiol.* **64**, 164–171 (2017).

48. Wagner, M. & MacLauchlin, J. Handbook of *Listeria monocytogenes*. in (ed. Liu D.) 3–25 (CRC Press, 2008).
49. Liu, D. *Handbook of Listeria monocytogenes*. (CRC press, 2008).
50. Zhang, W., Jayarao, B. M. & Knabel, S. J. Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 913–920 (2004).
51. Hyden, P. *et al.* Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates. *J. Biotechnol.* **235**, 181–186 (2016).
52. Chen, Y. & Perfect, J. R. Efficient, Cost-Effective, High-Throughput, Multilocus Sequencing Typing (MLST) Method, NGMLST, and the Analytical Software Program MLSTEZ. in *Genotyping* 197–202 (Springer, 2017).
53. Kim, S. W. *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* **13**, 1–17 (2018).
54. Félix, B. *et al.* Population genetic structure of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the pig and pork production chain in France. *Front. Microbiol.* **9**, 684 (2018).
55. Pavón, A. B. I. & Maiden, M. C. J. Multilocus sequence typing. in *Molecular Epidemiology of Microorganisms* 129–140 (Springer, 2009).
56. Chen, Y., Zhang, W. & Knabel, S. J. 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 (2007).
57. Parisi, A. *et al.* Amplified fragment length polymorphism and multi-locus sequence typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiol.* **27**, 101–108 (2010).
58. Lomonaco, S., Knabel, S. J., Dalmaso, A., Civera, T. & Bottero, M. T. Novel multiplex single nucleotide polymorphism-based method for identifying epidemic clones of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6290–6294 (2011).
59. Knabel, S. J. *et al.* Sequence typing confirms that a predominant *Listeria monocytogenes* clone caused human listeriosis cases and outbreaks in Canada from 1988 to 2010. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 1748–1751 (2012).
60. Lepe, J. A., Torres, M. J., Liró, J., Luque, R. & Aznar, J. Caracterización microbiológica de los aislados de *Listeria monocytogenes* procedentes de casos humanos en Andalucía. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **30**, 602–607 (2012).
61. Bortolussi, R. Listeriosis: a primer. *Cmaj* **179**, 795–797 (2008).
62. Graves, L. M. *et al.* Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the PulseNet network. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2350–2355 (2005).
63. Swaminathan, B. & Gerner-Smidt, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* **9**, 1236–1243 (2007).
64. Castañeda-ruelas, G. *et al.* ENSAYO Listeriosis en México : importancia clínica y epidemiológica. (2014).

65. Rychli, K. *et al.* Listeria monocytogenes isolated from illegally imported food products into the European Union harbor different virulence factor variants. *Genes (Basel)*. **9**, (2018).
66. Control, E. C. for D. P. and Authority, E. F. S. Multi-country outbreak of Listeria monocytogenes clonal complex 8 infections linked to consumption of cold-smoked fish products. *EFSA Support. Publ.* **16**, 1665E (2019).
67. Prevention, C. for D. C. and. Foodborne Illness Surveillance, Response, and Data Systems. *Natl. Cent. Emerg. Zoonotic Infect. Dis. (NCEZID), Div. Foodborne, Waterborne, Environ. Dis. (DFWED), USA* (2015).
68. Smith, A. M. *et al.* Outbreak of Listeria monocytogenes in South Africa, 2017–2018: Laboratory activities and experiences associated with whole-genome sequencing analysis of isolates. *Foodborne Pathog. Dis.* **16**, 524–530 (2019).
69. Thomas, J. *et al.* Outbreak of listeriosis in South Africa Associated with processed meat. *N. Engl. J. Med.* **382**, 632–643 (2020).
70. Chen, M. *et al.* Occurrence, antibiotic resistance, and population diversity of listeria monocytogenes isolated from fresh aquatic products in China. *Front. Microbiol.* **9**, 1–11 (2018).
71. Huang, Y. T. *et al.* Disease burden of invasive listeriosis and molecular characterization of clinical isolates in Taiwan, 2000–2013. *PLoS One* **10**, 4–15 (2015).
72. Feng, Y. *et al.* Systematic review of human listeriosis in China, 1964–2010. *Trop. Med. Int. Heal.* **18**, 1248–1256 (2013).
73. Li, W. *et al.* The Epidemiology of Listeria monocytogenes in China. *Foodborne Pathog. Dis.* **15**, 459–466 (2018).
74. Todd, E. C. D. & Notermans, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, Listeria monocytogenes. *Food Control* **22**, 1484–1490 (2011).
75. McKercher, C. M., Stephens, N. & Group, O. W. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet network, 2010. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* **36**, E213–E241 (2012).
76. Oxaran, V. *et al.* Listeria monocytogenes incidence changes and diversity in some Brazilian dairy industries and retail products. *Food Microbiol.* **68**, 16–23 (2017).
77. Blum-Menezes, D. *et al.* Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **46**, 381–383 (2013).
78. Sedano, R. *et al.* Infecciones por Listeria monocytogenes, una experiencia de dos décadas: A two decade experience. *Rev. Chil. infectología* **30**, 417–425 (2013).
79. Hilliard, A. *et al.* Genomic characterization of listeria monocytogenes isolates associated with clinical listeriosis and the food production environment in Ireland. *Genes (Basel)*. **9**, (2018).
80. Melero, B. *et al.* Listeria monocytogenes colonization in a newly established dairy processing facility. *Int. J. Food Microbiol.* **289**, 64–71 (2019).
81. Chenal-Francisque, V. *et al.* World wide distribution of major clones of listeria monocytogenes. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1110–1112 (2011).

82. Althaus, D. *et al.* Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated during 2011-2013 from human infections in Switzerland. *Foodborne Pathog. Dis.* **11**, 753–758 (2014).
83. Zhang, Y. *et al.* Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. *Front. Microbiol.* **10**, 1–14 (2019).
84. Melero, B. *et al.* Distribution and Persistence of *Listeria monocytogenes* in a Heavily Contaminated Poultry Processing Facility. *J. Food Prot.* **82**, 1524–1531 (2019).
85. Zhang, X. *et al.* Isolation and characterization of clinical *Listeria monocytogenes* in Beijing, China, 2014-2016. *Front. Microbiol.* **10**, 1–11 (2019).
86. McLauchlin, J., Mitchell, R., Smerdon, W. J. & Jewell, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int. J. Food Microbiol.* **92**, 15–33 (2004).
87. Bergholz, T. M., Shah, M. K., Burall, L. S., Rakic-Martinez, M. & Datta, A. R. Genomic and phenotypic diversity of *Listeria monocytogenes* clonal complexes associated with human listeriosis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 3475–3485 (2018).
88. Cardenas-Alvarez, M. X., Ramsett, M. K. T., Malekmohammadi, S. & Bergholz, T. M. Evidence of hypervirulence in *Listeria monocytogenes* clonal complex 14. *J. Med. Microbiol.* **68**, 1677–1685 (2019).
89. Chen, M. *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* sequence type 121 strains using a novel multiplex PCR assay. *Lwt* **116**, 108474 (2019).
90. Maury, M. M. *et al.* Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. *Nat. Genet.* **48**, 308 (2016).
91. Centre for Enteric Diseases and Division of Public Health Surveillance and Response. Situation report on listeriosis outbreak, South Africa, 2018. **2018**, 1–3 (2018).
92. Cantinelli, T. *et al.* Epidemic clones" of *Listeria monocytogenes* are widespread and ancient clonal groups. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 3770–3779 (2013).
93. Quereda, J. J., Meza-Torres, J., Cossart, P. & Pizarro-Cerdá, J. Listeriolysin S: A bacteriocin from epidemic *Listeria monocytogenes* strains that targets the gut microbiota. *Gut Microbes* **0976**, 1–8 (2017).
94. Ricci, A. *et al.* *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA J.* **16**, (2018).
95. Nielsen, E. M. *et al.* Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. *EFSA Support. Publ.* **14**, 1151E (2017).
96. Jami, M., Ghanbari, M., Zunabovic, M., Domig, K. J. & Kneifel, W. *Listeria monocytogenes* in aquatic food products-A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 798–813 (2014).
97. Chen, Y. *et al.* Assessing the genome level diversity of *Listeria monocytogenes* from contaminated ice cream and environmental samples linked to a listeriosis outbreak in the United States. *PLoS One* **12**, 1–19 (2017).

98. Van Boeckel, T. P. *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 5649–5654 (2015).
99. Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C. & Lassmann, B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *Int. J. Infect. Dis.* **84**, 48–53 (2019).