

## PERFIL DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* DE PRODUTOS PRONTOS PARA O CONSUMO

**CAROLINA SANTURIO SCHIAVON<sup>1</sup>; CAROLINE KRAUSE BIERHALS<sup>2</sup>; GIOVANA WINK FALEIRO<sup>3</sup>; LUIZ GUSTAVO BACH<sup>4</sup>; MARIA GIRÃO BERWALDT<sup>5</sup>; GRACIELA VÖLZ LOPES<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – santurioschiavon@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinekbierhals@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – giovanawink@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – mariagber@icloud.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – graciavolzes@yahoo.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é um patógeno de relevância para saúde pública desde a década de 80, quando se constatou seu papel como patógeno de origem alimentar (SCHLECH *et al.*, 1983). Causa uma enfermidade chamada listeriose e apresenta elevada taxa de letalidade (20% a 30%), acometendo principalmente idosos, gestantes, neonatos e indivíduos imunocomprometidos (FORSYTHE, 2013). Trata-se de uma bactéria psicrotrófica e ubíqua, capaz de persistir no ambiente de processamento de alimentos, disseminando-se através da formação de biofilme em superfícies e equipamentos (GU *et al.*, 2021). Em alimentos, *L. monocytogenes* se multiplica mesmo em condições desfavoráveis, como pH ácido, presença de sais de cura e concentrações elevadas de sal (FORSYTHE, 2013). Torna-se especialmente preocupante em alimentos prontos para consumo (*ready-to-eat*, RTE), tais como produtos cárneos, embutidos fermentados, queijos, peixes, iogurtes, manteigas, bebidas lácteas (EFSA, 2024; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; CHURCHILL *et al.*, 2019).

Além da resistência a condições ambientais adversas, *L. monocytogenes* apresenta genes de virulência essenciais para a infecção, tais como *prfA*, *plcA*, *hlyA* e *actA*, responsáveis pela regulação de transcrição, evasão do sistema imune, invasão celular e disseminação intracelular (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001), sendo eles determinantes para o alto potencial de virulência da bactéria (WIKTORCZYK-KAPISCHKE *et al.*, 2023). Somado a isso, o aumento da resistência a antimicrobianos em isolados de origem alimentar representa um desafio para a segurança dos alimentos e para a eficácia das terapias antimicrobianas disponíveis (GRUDLEWSKA-BUDA *et al.*, 2023). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *L. monocytogenes* proveniente de produtos prontos para o consumo.

### 2. METODOLOGIA

Foram avaliados neste estudo 11 isolados de *L. monocytogenes*, previamente identificados, provenientes de produtos prontos para o consumo do varejo da cidade de Pelotas/RS. A coleta foi realizada em março de 2025 em 10 estabelecimentos distintos e foram coletadas amostras de queijo e mortadela fatiados. O perfil de virulência dos isolados foi avaliado pela presença dos genes *prfA*, *plcA*, *hly* e *actA*, utilizando primers previamente descritos na literatura (LOMONACO *et al.*, 2012; KAUR

et al., 2009). As amplificações por PCR *simplex* foram realizadas com volume total de 25 µL, sendo 12,5 µL de Taq Pol Master Mix Green (Cellco®), 1 µL de cada par de primer (Forward e Reverse), 8,5 µL de água destilada ultrapura e 2 µL de DNA template. Como controle positivo foi utilizada a cepa padrão ATCC 7644 e, para controle negativo, água destilada ultrapura. Posteriormente, a eletroforese foi realizada com gel de agarose 1,5%. A visualização e captura de imagem foi realizada em fotodocumentador sob transiluminador UV.

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi executado de acordo com o Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST, 2025), pelo método qualitativo de disco-difusão em ágar. Como critério, foram incluídos antimicrobianos que possuem pontos de corte estabelecidos pela EUCAST: benzilpenicilina ( $\geq 13$  mm), ampicilina ( $\geq 16$  mm), meropenem ( $\geq 26$  mm), eritromicina ( $\geq 25$  mm) e trimetoprim-sulfametoxazol ( $\geq 29$  mm). Os isolados foram reativados em caldo Triptona de Soja (KASVI®, Itália) com Extrato de Levedura 0,6% (KASVI®, Espanha) (TSB-YE) e incubados a 30 °C por 24 h. Após recuperação, a cultura foi padronizada a 0,5 na escala de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e inoculada com *swab* estéril em placas de ágar Mueller-Hinton (KASVI®, Espanha) suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado e 20 mg.L<sup>-1</sup> de β-NAD (SIGMA-ALDRICH®, EUA) e, semeadas de forma a ser obtido crescimento confluente das colônias. As placas foram incubadas a 37 °C por 18 h. Foi realizada a leitura dos halos de inibição ao redor dos discos e os resultados expressos em milímetros.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise molecular dos 11 isolados de *L. monocytogenes* revelou elevada frequência de genes de virulência associados à Ilha de Patogenicidade LIPI-1. O gene *prfA*, considerado regulador mestre da expressão dos demais genes de virulência pesquisados, foi detectado em 90,9% dos isolados, indicando forte potencial para ativação da cascata regulatória. Os genes *plcA*, *hlyA* e *actA*, diretamente relacionados à lise do vacúolo e disseminação intracelular, foram identificados em 81,8% dos isolados. Apenas dois isolados não apresentaram alguns dos genes pesquisados, reforçando que a maioria das cepas carrega múltiplos determinantes envolvidos na patogenicidade. Esses achados estão em consonância com estudos prévios que demonstram a conservação de LIPI-1 na maioria das linhagens de *L. monocytogenes*, sobretudo em isolados de alimentos (GANDHI; CHIKINDAS, 2007). Em estudo recente, ŽURAWIK et al. (2024) detectaram a presença dos genes *prfA* e *hlyA* em todas as cepas e JAMALI et al. (2015) obtiverem uma frequência de 95,3%, 97,7%, 100% e 100% para *plcA*, *prfA*, *actA* e *hlyA*, respectivamente. A elevada taxa de detecção dos genes sugere que mesmo em cepas ambientais ou de alimentos, há potencial significativo de virulência, o que constitui risco relevante para a saúde.

Os resultados obtidos revelaram que todos os isolados foram susceptíveis aos antimicrobianos testados, baseado nos pontos de corte estabelecidos pela EUCAST (2025). Em média, a análise dos halos de inibição (mm) demonstrou discreta variação no perfil de susceptibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* frente aos cinco antimicrobianos avaliados. O meropenem apresentou a maior média de halo ( $35,55 \pm 0,52$  mm), seguido de trimetoprim-sulfametoxazol ( $34,64 \pm 1,69$  mm), ampicilina ( $32,91 \pm 1,76$  mm) e eritromicina ( $32,91 \pm 2,02$  mm), embora eritromicina tenha evidenciado maior variabilidade entre os isolados. A benzilpenicilina apresentou a menor média ( $25,27 \pm 1,10$  mm). Perfis de sensibilidade semelhantes foram

observados por TSITSOS *et al.* (2025) e ŻURAWIK *et al.* (2024), evidenciando a susceptibilidade dos isolados avaliados com os mesmos antimicrobianos.

Tabela 1 – Perfil de virulência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* de produtos prontos para o consumo (ready-to-eat, RTE)

Isolados	Origem	Data de isolamento	Mercado	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos <sup>a</sup>	Perfil de virulência <sup>b</sup>
1	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
2	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
3	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
4	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
5	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
6	Queijo Mussarela	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
7	Mortadela tipo <i>Bologna</i>	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
8	Mortadela tipo <i>Bologna</i>	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
9	Mortadela tipo <i>Bologna</i>	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA, plcA, hlyA, actA</i>
10	Mortadela tipo <i>Bologna</i>	11/03/2025	3	Susceptível	-
11	Mortadela tipo <i>Bologna</i>	11/03/2025	3	Susceptível	<i>prfA</i>

<sup>a</sup>Antimicrobianos testados: benzilpenicilina, ampicilina, meropenem, eritromicina e trimetoprim-sulfametoazol (EUCAST, 2025).

<sup>b</sup>Perfil de virulência: “-” significa que nenhum gene foi detectado.

#### 4. CONCLUSÕES

A partir dos testes realizados, foi possível inferir que, apesar de não apresentarem perfil de resistência aos antimicrobianos, pelo menos 81,8% dos isolados apresentaram os genes de virulência investigados. Os resultados são relevantes pois a presença dos genes sugere que os produtos prontos para o consumo comercializados em Pelotas/RS possuem potencial de causar doença aos consumidores, especialmente na população de risco.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONCEIÇÃO, S.; QUEIROGA, M. C.; LARANJO, M. Antimicrobial Resistance in Bacteria from Meat and Meat Products: A One Health Perspective. *Microorganisms*, v. 11, n. 10, p. 1-21, 2023.

CHURCHILL, K. J.; SARGEANT, J. M.; FARBER, J. M.; O'CONNOR, A. M. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Select Ready-to-Eat Foods – Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Food Protection*, v. 82, n. 2, p. 344-357, 2019.

EFSA; ECDC (European Food Safety Authority; European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal*, v. 22, n. 12, p. 1-201, 2024.

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters*. Version 15.0, 2025. <https://www.eucast.org>.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. Porto Alegre: Artmed, 2013.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GRUDLEWSKA-BUDA, K.; BAUZA-KASZEWSKA, J.; WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E.; SKOWRON, K. Antibiotic Resistance in Selected Emerging Bacterial Foodborne Pathogens: An Issue of Concern? **Antibiotics**, v. 12, n. 880, p. 1-29, 2023.

GU, T.; MEESRISOM, A.; LUO, Y.; DINH, Q. N.; LIN, S.; YANG, M.; SHARMA, A.; TANG, R.; ZHANG, J.; JIA, Z.; MILLNER, P.; PEARLSTEIN, A. J.; ZHANG, B. *Listeria monocytogenes* biofilm formation as affected by stainless steel surface topography and coating composition. **Food Control**, v. 130, n. 108275, p. 2-11, 2021.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; ISMAIL, S.; LOOI, C. Y.; WONG, G. F.; RADMERH, B.; ABEDINI, A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 144, 2015.

KAUR, S.; MALIK S. V.; BHILEGAONKAR, K.; VAIDYA, V. M.; BARBUDDHE, S.B. Use of a phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp. **The Veterinary Journal**, v.184, p.366-370, 2009.

LOMONACO, S., PATTI, R., KNABEL, S. J., CIVER, T. Detection of virulence associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.76-79, 2012.

SCHLECH, W. F. 3RD; LAVIGNE, P. M.; BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C.; HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, v. 308, n. 4, p. 203-206, 1983.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2015.

TSITSOS, A.; PERATIKOS, P.; DAMIANOS, A.; KYRITSI, M. A.; ARSENOS, G.; HADJICHRISTODOULOU, C.; SOULTOS, N.; GOUSIA, P.; ECONOMOU, V. Prevalence, molecular characterization, antibiotic resistance, and investigation of transmission pathways of *Listeria monocytogenes* strains isolated along the beef production chain. **Food Microbiology**, v. 129, n. 104745, 2025.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

WIKTORCZYK-KAPISCHKE, N.; SKOWRON, K.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E. Genomic and pathogenicity islands of *Listeria monocytogenes* – overview of selected aspects. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 10, n. 1161486, p. 1-30, 2023.

ŻURAWIK, A.; KASPERSKI, T.; OLECHOWSKA-JARZĄB, A.; SZCZESIUL-PASZKIEWICZ, P.; ŻAK, I.; WÓJCICKI, M.; MAĆKIW, E.; CHMIELARCZYK, A. Genetic Diversity, Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* from Food and Clinical Samples in Southern Poland. **Pathogens**, v. 13, n. 725, p. 1-15, 2024.