

## Caraterização molecular e suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *Listeria monocytogenes* na região de Lisboa e Vale do Tejo em 2015

*Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of Listeria monocytogenes in the Lisbon and Tagus Valley Region in 2015*

Leonor Silveira<sup>1</sup>, Ângela Pista<sup>1</sup>, Carla Maia<sup>3</sup>, Maria João Barreira<sup>3</sup>, João Rodrigues<sup>2</sup>, Lúcia Reis<sup>2</sup>, Jorge Machado<sup>1</sup>

leonor.silveira@insa.min.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais; (2) Laboratório de Microbiologia, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

(3) Laboratório de Microbiologia, Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

*Listeria monocytogenes* é o agente causal da listeriose, uma doença grave considerada de vigilância prioritária a nível europeu, com taxas de hospitalização (98,9%) e de letalidade (15,0%) elevadas. Este estudo teve como objetivo a caraterização das estirpes de *L. monocytogenes* recebidas no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em 2015. A serotipagem foi realizada por PCR multiplex, a tipagem por PFGE e também foi estudada a suscetibilidade aos antimicrobianos. O serotipo mais comum foi IVb (85,7%). A maioria das estirpes é sensível aos antimicrobianos em apreciação, com exceção de uma estirpe que apresentou resistência ao meropenemo e outra que apresentou resistência à eritromicina e ao trimetoprim/sulfametoxazol. Existe uma grande heterogeneidade de perfis de PFGE entre os isolados estudados, tendo sido detetados alguns clusters. A utilização de sequenciação de genoma completo para caraterização de estirpes, nomeadamente de *L. monocytogenes* está a ganhar terreno a nível mundial, vindo substituir as técnicas goldstandard. A sua aplicação no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais permitiu em 2015 a confirmação laboratorial de um surto.

### \_Abstract

*Listeria monocytogenes* is the listeriosis agent, a serious disease under priority surveillance in Europe, with high mortality (15.0%) and hospitalization rates (98.9%). This study aims to characterize the *Listeria monocytogenes* strains received in the National Reference Laboratory of Gastrointestinal Infections of the National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge in 2015. Serotyping was accomplished by multiplex PCR, typing by PFGE and the antimicrobial susceptibility was evaluated. The most common serotype was IVb (85.7%). Most strains are sensitive to the antimicrobials under consideration, with the exception of a strain that was resistant to meropenem and other that was resistant to erythromycin and trimethoprim/sulfamethoxazole. There is great heterogeneity between the PFGE profiles of the isolates under study, and some clusters have been detected. The use of whole sequencing for the characterization of strains namely *L. monocytogenes* surveillance is gaining ground worldwide, replacing the goldstandard techniques. Its application in the National Reference Laboratory of Gastrointestinal Infections allowed the effective resolution of an outbreak in 2015.

### \_Introdução e objetivo

*Listeria monocytogenes* é o agente causal da listeriose, uma doença grave, considerada de vigilância prioritária a nível europeu. Os casos confirmados notificados na Europa em 2014, indicam uma taxa de incidência de 0,52 casos por 100.000 habitantes com taxas de hospitalização (98,9%) e de letalidade (15,0%) elevadas (1,2). *L. monocytogenes* é uma bactéria intracelular anaeróbia facultativa, ubiqüitária, que se transmite através de géneros alimentícios prontos para consumo (3).

*L. monocytogenes* é uma bactéria oportunista, que causa normalmente infeções sistémicas, tais como meningite, encefalite ou endocardite, as quais podem ser potencialmente fatais em indivíduos imunocomprometidos e idosos. Estas infeções podem também afetar grávidas, podendo provocar aborto, parto prematuro, nados-mortos ou infeções neonatais (3).

Este estudo tem como objetivo a caraterização molecular e o estudo da suscetibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *Listeria monocytogenes* recebidas no Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) em 2015.

### \_Material e métodos

Durante o ano de 2015 foram recebidas no INSA 28 estirpes humanas de *L. monocytogenes*, provenientes de doentes internados em hospitais da região de Lisboa e Vale do Tejo, isoladas a partir de sangue (n=17), líquido cefalorraquidiano (LCR) (n=6), sangue e LCR (n=2), sangue e exsudado ocular (n=1) e de origem desconhecida (n=2).

artigos breves\_ n. 5

Os serogrupos foram determinados por PCR *multiplex*, como descrito por Doumith *et al.* (2004), utilizando oligonucleótidos que amplificam os genes *Imo0737*, *ORF2819*, *ORF2110*, *Imo1118* e *prs* (4).

Foi possível detetar a suscetibilidade aos antimicrobianos em 24 estirpes, segundo as recomendações da EUCAST, para os antibióticos benzilpenicilina (P), meropenemo (MEM), eritromicina (ERY) e trimetoprim/sulfametoxazol (SXT).

A tipagem de 27 estirpes foi efetuada por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) com as enzimas de restrição *Apal* e *Ascl*, de acordo com o procedimento elaborado pelo *PulseNet* (CDC) (5). As imagens foram processadas no *software* Bionumerics (1998, 2003; Applied Maths BVBA). A análise de *clusters* dos pulsotipos foi realizada através da aplicação do coeficiente Dice para comparação dos diferentes perfis.

### \_Resultados e discussão

A maior parte dos casos de listeriose ocorreu entre maio e agosto de 2015 (n=16) (gráfico 1). Do total de 28 doentes, 10 eram do sexo feminino (sem casos de gravidez associados) e 18 do sexo masculino. A população mais afetada pertencia à faixa etária superior a 65 anos de idade (n=14), seguida do grupo entre os 18 e os 64 anos de idade (n=11). Registaram-se ainda 3 casos em recém-nascidos.

Gráfico 1: Número de casos de listeriose por mês de diagnóstico, 2015.



No total das 28 estirpes de *L. monocytogenes* recebidas no INSA, o serotipo mais comum foi o IVb (85,7%) (tabela 1), um dos mais frequentemente associados a surtos de listeriose humana a nível mundial nos últimos 30 anos (3). Houve ainda 3 (10,7%) estirpes pertencentes ao serotipo IIa e uma (3,6%) ao IIb. Nenhuma das estirpes estudadas apresentou o serotipo IIc.

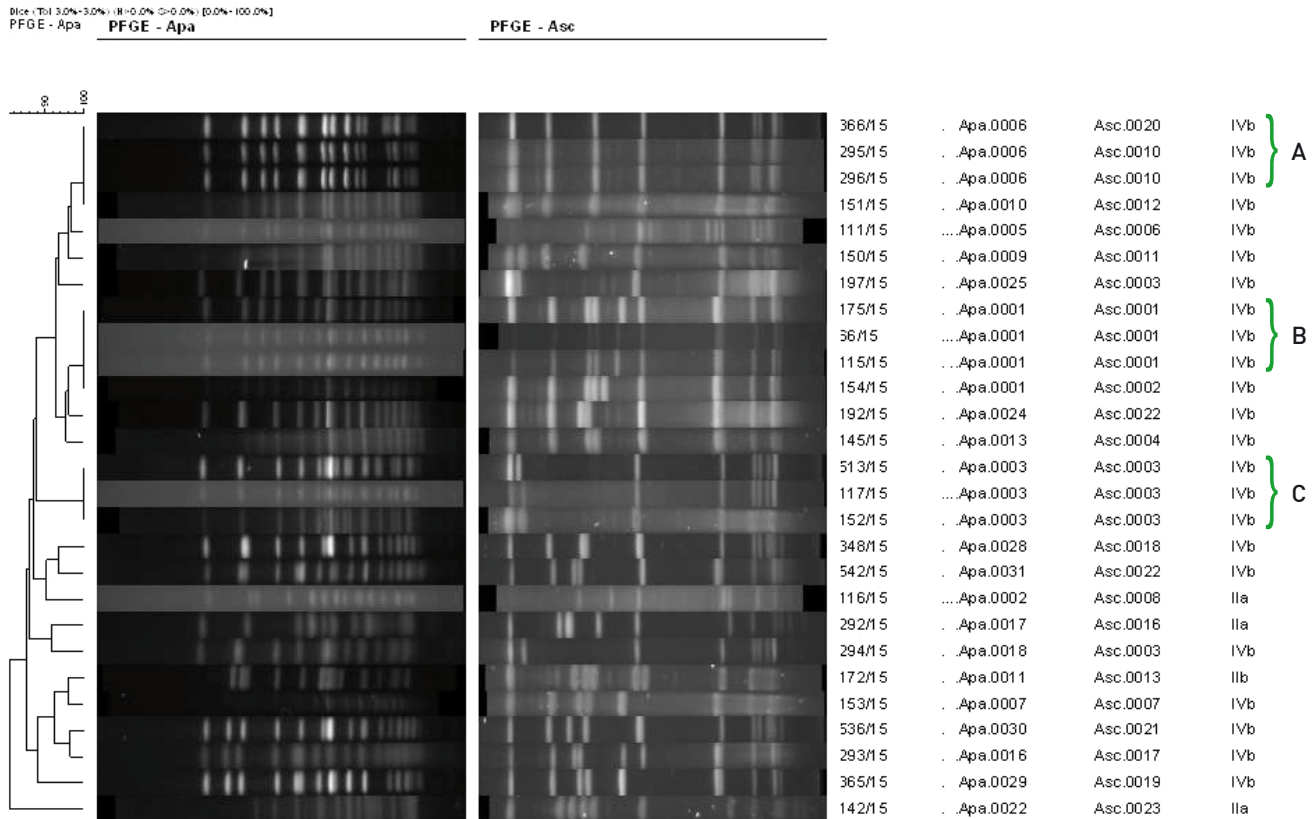
Tabela 1: Número e percentagem de estirpes de *Listeria monocytogenes* por serogrupo, 2015.

Nº (%) de estirpes isoladas por serogrupo				Total
IIa	IIb	IIc	IVb	
3 (10,7)	1 (3,6)	0	24 (85,7)	28 (100)

Vinte e duas das 24 estirpes de *L. monocytogenes* testadas foram sensíveis aos antimicrobianos em apreciação. Uma estirpe apresentou resistência ao meropenemo e outra resistência à eritromicina e ao trimetoprim/sulfametoxazol.

Foi observada uma grande heterogeneidade de perfis de PFGE entre os isolados de *L. monocytogenes* em estudo. Com base na análise combinada dos perfis de PFGE com as enzimas *Apal* e *Ascl*, foram identificados 21 perfis diferentes (figura 1). Destes, 19 ocorreram em apenas um isolado. Foram identificados 3 clusters com perfis de PFGE bastante próximos (*clusters* A, B e C). Relativamente ao cluster A, as 3 estirpes (295/15, 296/15 e 366/15) provinham do mesmo hospital e foram associadas à ocorrência de um surto com origem em géneros alimentícios prontos para consumo. A evidência e investigação deste surto foram complementadas através da sequenciação total do genoma dos isolados. Quanto aos *clusters* B e C, e devido à distância temporal entre os isolamentos das estirpes em ambos os *clusters*, não foi prosseguida a investigação epidemiológica.

Figura 1: ⬇ Perfis de PFGE com as enzimas de restrição *ApaI* e *AscI* de 27 estirpes de *Listeria monocytogenes*, 2015.



## \_Conclusão

Apesar de na última década se ter observado em toda Europa e América do norte uma inversão da frequência do serotipo mais comum, o IVb, para o serotipo IIa (6), verificou-se que neste estudo, o serogrupo IVb foi o mais identificado.

Ainda de acordo com este estudo, constatou-se que relativamente à resistência aos antibióticos apenas duas estirpes apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico.

Considerando que desde 2014 a listeriose é uma doença de notificação obrigatória a nível nacional (8), e que a Portaria nº 22/2016, de 10 de fevereiro, torna obrigatória a notificação laboratorial a partir de 1 de janeiro de 2017, de futuro existirá um melhor conhecimento relativamente à situação da Listeriose em Portugal.

A técnica de PFGE é cada vez menos utilizada nos Laboratórios de Referência a nível europeu, tendo vindo a ser substituída pela sequenciação total do genoma. Neste contexto, também o Laboratório Nacional de Referência de Infecções Gastrointestinais está apto a utilizar esta nova tecnologia para tipagem das estirpes de *L. monocytogenes* recebidas no INSA.

## Agradecimentos:

Os autores agradecem ao CH do Oeste, Laboratório Labco, CH de Lisboa Ocidental, Hospital Prof. Doutor Fernando Fonseca, CH de Lisboa Central, CH de Lisboa Norte, Hospital SAMS e Hospital CUF Infante Santo o envio das estirpes de *Listeria monocytogenes*. Agradecem também ao Dr. Carlos Orta Gomes da ARSLVT pela sua colaboração e disponibilidade e à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

**Referências bibliográficas:**

- (1) European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of seven priority food- and waterborne diseases in the EU/EEA, 2010-2012. Stockholm: ECDC, 2015. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/publications/food-and-waterborne-diseases-surveillance-report-2015.pdf>
- (2) European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329. [www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4329)
- (3) Lomonaco S, Nucera D, Filippello. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infect Genet Evol.* 2015;35:172-83.
- (4) Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42(8):3819-22. [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497638/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC497638/)
- (5) Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol.* 2001;65(1-2):55-62.
- (6) Marini E, Magi G, Vincenzi C, et al. Ongoing outbreak of invasive listeriosis due to serotype 1/2a *Listeria monocytogenes*, Ancona province, Italy, January 2015 to February 2016. *Euro Surveill.* 2016;21(17):pii=30217. [www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22460](http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22460)
- (7) Gómez D, Azón E, Marco N, et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* 2014;42:61-5.
- (8) Ministério da Saúde. Direção-Geral da Saúde. Despacho n.º 5681-A/2014, de 29 de abril. DR 2.ª série, n.º 82: 11374-(2)-(20). Retificado pela Declaração de retificação n.º 609-A/2014, de 16 de junho. DR n.º 113/2014, 2.ª série (supl.1):15630-(2)-(20). Notificação obrigatória de doenças transmissíveis e outros riscos em saúde pública. <https://dre.pt/application/file/25705380>