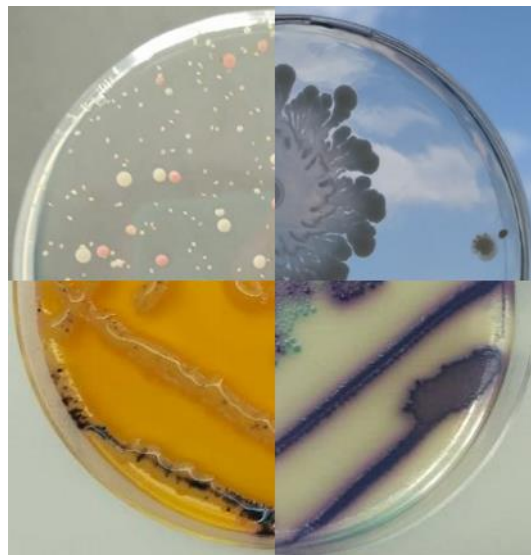




# Controlo da Qualidade Microbiológica de Alimentos e Águas

Caracterização de isolados de *Listeria  
monocytogenes*

Élia Simões Fogueiro

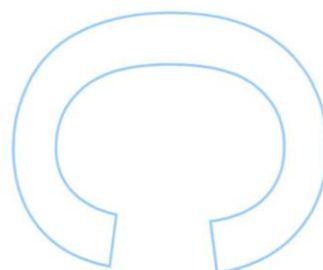
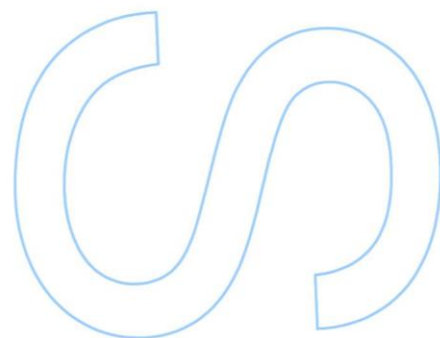
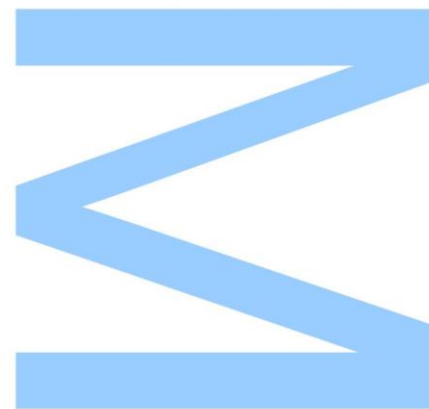
Mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar  
Departamento de Química e Bioquímica  
2017

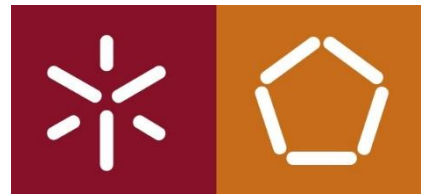
**Orientador**

Prof. Dr. Fernando Tavares, Professor Auxiliar, FCUP

**Coorientador**

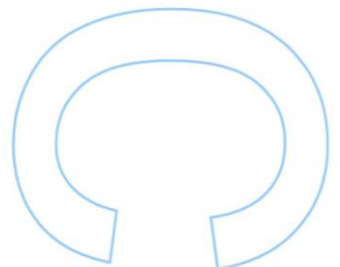
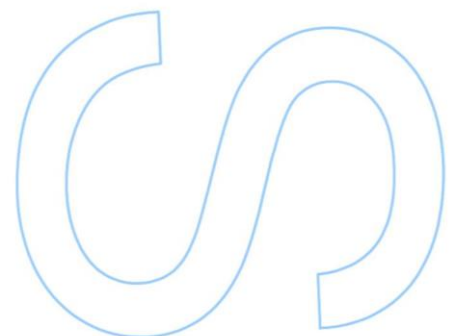
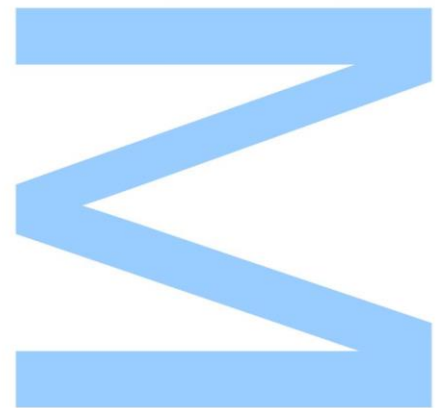
Prof. Dr. Pedro Rocha, Laboratórios Brito Rocha Lda.





Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.  
O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



## Agradecimentos

Gostaria de agradecer às pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram a concretizar este trabalho.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Fernando Tavares, pelo apoio e ajuda prestada ao longo deste ano e por me ter incentivado a fazer algo mais para além do estágio;

Ao Prof. Dr. Pedro Rocha por me ter dado a possibilidade de estagiar no Laboratório Brito Rocha Lda., e ao Rui, Diana e Celina pelos conhecimentos transmitidos;

À Mariana, por ter sido fundamental na parte inicial do estágio, quer pela transmissão de conhecimentos, quer pela ajuda na integração na empresa;

À Sofia e Cristina, pela companhia durante os dias de escrita e correções, e ao Dr. Pedro Albuquerque disponibilidade em me ensinar as técnicas de laboratório que foram essenciais para concretização deste estudo;

Ao Pedro e aos meus amigos;

Por fim, aos meus pais e irmã pelo apoio incessante e por me terem proporcionado todas as condições que permitiram que eu estudasse e chegasse até aqui.

O meu muito obrigado!

## Resumo

Nos últimos anos o aumento das toxi-infeções alimentares revelou-se uma importante preocupação em termos de saúde pública em todo o mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que todos os anos, uma em cada dez pessoas adoece devido à ingestão de alimentos contaminados. A análise microbiológica de águas e alimentos é, assim, fundamental para garantir que a indústria alimentar cumpre as diretrizes exigidas na legislação em termos de segurança alimentar e para salvaguardar os interesses dos consumidores, ao prevenir a entrada de produtos alimentares potencialmente contaminados com patógenos no mercado. O estágio teve como objetivo a familiarização com a rotina de trabalho de um laboratório de ensaio acreditado para a análise de águas e alimentos, desde a recolha de amostras até aos testes confirmatórios, em conformidade com as diretrizes e legislação nacional para a segurança alimentar. Adicionalmente, pretendeu-se complementar as análises de referência com técnicas de genotipagem que fossem informativas para obter dados epidemiológicos importantes para os produtores, usando como objeto de estudo a *Listeria monocytogenes*. Esta é uma bactéria ubíqua e amplamente distribuída no ambiente, que pode causar infeções graves, potencialmente fatais, nomeadamente bacteremia invasiva, meningoencefalite e aborto espontâneo. Neste estudo procedeu-se à análise de 768 amostras de alimentos, recolhidas pelo Laboratório Brito Rocha Lda, e provenientes de nove empresas distintas (#1 a #9), das quais 52 foram positivas para *L. monocytogenes*, tendo-se obtido 56 isolados. Verificou-se que 48 amostras correspondem a alimentos ou superfícies provenientes da indústria de produção de queijos, confirmando trabalhos anteriores, que implicam este tipo de matriz alimentar em surtos e em casos de listeriose esporádica em Portugal e não só. Através da análise das sequências parciais do gene 16S rRNA concluiu-se que dos 56 isolados, identificados como presuntivos de *L. monocytogenes*, três correspondiam na realidade a dois isolados de *Cellulosimicrobium* spp. e um de *Enterococcus faecalis*, sendo, portanto, considerados falsos positivos para a presença de *L. monocytogenes*. A posterior análise por multiplex PCR, para caracterização genotípica permitiu verificar que 28 dos isolados pertencem à linhagem II, frequentemente associada a casos de listeriose esporádica em humanos.

A abordagem de identificação por sequenciação do gene 16S rRNA e genotipagem por duplex PCR realizada neste trabalho, evidência a necessidade de

rever a metodologia utilizada no laboratório para a deteção e identificação de *L. monocytogenes* em amostras alimentares, e fornece informação instrumental para que os produtores possam implementar medidas de desinfeção direccionadas e um controlo mais apertado das matérias primas, de maneira a prevenir contaminações por *L. monocytogenes* em géneros alimentícios.

# Abstract

In recent years, the raising of foodborne intoxications and infections have shown to be a major concern of public health around the world. According WHO (World Health Organization) estimations, every year 10% of the world population falls ill due to the consumption of contaminated food. Microbiological analysis of water and foodstuff is essential to ensure that the food industry complies with the regulation guidelines, and to safeguard the interests of consumers, by preventing the entrance of potentially contaminated products into the market. The internship at a certified microbiology laboratory to screen foodstuff, aimed to get acquainted with the work routines, from sampling to confirmatory tests, of an accredited laboratory for water and food analysis, in accordance with the international standards and national legislation on food security. Additionally, an effort was made to complement the reference detection methods of *Listeria monocytogenes* with genotyping techniques that could provide informative data to infer epidemiological patterns, particularly useful for the producers. *Listeria monocytogenes* is a ubiquitous and widely distributed bacterium species in the environment, which can cause potentially fatal infections, namely invasive bacteremia, meningoencephalitis and miscarriage. In the present study, we analysed 768 food samples at the Laboratório Brito Rocha Lda. from nine different companies (# 1 to # 9), from which 52 samples were positive for *L. monocytogenes*, resulting in 56 isolates. The results showed that 48 samples corresponded to foodstuffs or surfaces related to the cheese industry, corroborating previous studies implicating this food matrix in outbreaks and sporadic cases of listeriosis in Portugal. The analysis of 16S rRNA gene sequences showed that, from the 56 isolates identified as presumptive *L. monocytogenes*, three isolates corresponded to two isolates of *Cellulosimicrobium* spp. and to one isolate of *Enterococcus faecalis*, indicating the occurrence of false positive for the presence of *L. monocytogenes*. Further analysis of all isolates by multiplex PCR, for genotypic characterization, has shown that 28 isolates belong to the lineage I, frequently associated sporadic listeriosis in humans.

The identification of *L. monocytogenes* by 16S rRNA gene sequencing and duplex PCR genotyping, carried out in the present work, emphasize the need to review the methodology used in the laboratory for *L. monocytogenes* detection and identification in food samples, and provides instrumental information for producers to implement better disinfection measures and a tight sanitary control of raw materials to prevent *L. monocytogenes* contaminations in foodstuffs.

# Índice

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Agradecimentos .....                                                         | 3  |
| Resumo .....                                                                 | 4  |
| Abstract .....                                                               | 6  |
| Lista de Tabelas .....                                                       | 9  |
| Lista de Figuras .....                                                       | 11 |
| Lista de Abreviaturas .....                                                  | 12 |
| <b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....                                         | 14 |
| Análise Microbiológica de Alimentos .....                                    | 15 |
| Microrganismos indicadores do nível de higiene dos processos .....           | 16 |
| Microrganismos indicadores da segurança dos géneros alimentícios .....       | 18 |
| Análise Microbiológica de Águas .....                                        | 19 |
| Águas de consumo .....                                                       | 20 |
| Águas recreacionais .....                                                    | 21 |
| Caracterização de isolados de <i>L. monocytogenes</i> .....                  | 22 |
| Persistência da <i>L. monocytogenes</i> em alimentos .....                   | 23 |
| Quadro clínico da Listeriose .....                                           | 24 |
| Dose infecciosa mínima .....                                                 | 26 |
| Mecanismo de infeção .....                                                   | 28 |
| Métodos para a tipagem de serovars de <i>L. monocytogenes</i> .....          | 29 |
| Patogenicidade de diferentes serovars de <i>L. monocytogenes</i> .....       | 30 |
| Dados epidemiológicos .....                                                  | 33 |
| Objetivos .....                                                              | 34 |
| <b>Capítulo 2 - Materiais e Métodos</b> .....                                | 35 |
| Controlo da qualidade microbiológica de alimentos .....                      | 36 |
| Preparação de amostras .....                                                 | 36 |
| Isolamento e deteção de <i>Salmonella</i> spp. ....                          | 36 |
| Isolamento e deteção de <i>L. monocytogenes</i> .....                        | 36 |
| Controlo da qualidade microbiológica de águas .....                          | 39 |
| Águas para consumo humano .....                                              | 39 |
| Águas recreacionais .....                                                    | 39 |
| Caracterização genotípica de isolados de <i>L. monocytogenes</i> .....       | 42 |
| Recolha de amostras para o estudo .....                                      | 42 |
| Extração e quantificação do DNA das células de <i>L. monocytogenes</i> ..... | 42 |

|                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Amplificação parcial da sequência do gene 16S rRNA .....                                 | 42  |
| Eletroforese, purificação e sequenciação dos produtos obtidos por PCR .....              | 43  |
| Determinação da linhagem dos isolados por multiplex PCR .....                            | 43  |
| <b>Capítulo 3 - Resultados e discussão</b> .....                                         | 45  |
| Controlo da qualidade microbiológica de alimentos.....                                   | 46  |
| Microrganismos indicadores do nível de higiene dos processos .....                       | 46  |
| Microrganismos indicadores da segurança dos géneros alimentícios .....                   | 47  |
| Controlo da qualidade microbiológica de águas .....                                      | 49  |
| Águas para consumo humano .....                                                          | 49  |
| Águas recreacionais .....                                                                | 50  |
| Caracterização de isolados de <i>L. monocytogenes</i> .....                              | 51  |
| Isolamento e identificação de <i>L. monocytogenes</i> .....                              | 51  |
| Sequenciação parcial do gene 16S rRNA de presumíveis <i>L. monocytogenes</i> .....       | 58  |
| Determinação da linhagem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> por multiplex PCR ..... | 62  |
| Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em Portugal .....                                  | 68  |
| Conclusões .....                                                                         | 69  |
| Normas da International Organization for Standardization (ISO).....                      | 70  |
| Referências Bibliográficas .....                                                         | 73  |
| Anexo I .....                                                                            | 85  |
| Anexo II .....                                                                           | 109 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Valores guia para avaliação microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (INSA 2005) .....                                                                                            | 18 |
| <b>Tabela 2</b> - Valores paramétricos para a água destinada a consumo humano fornecida por redes de distribuição e fontes ou reservatórios não ligados à rede de distribuição (Ministério do Ambiente 2007) .....                                   | 20 |
| <b>Tabela 3</b> - Valores paramétricos para águas pertencentes a espaços para atividades aquáticas como piscinas, lagoas ou <i>jacuzzi</i> (Ministério do Ambiente 1997).....                                                                        | 21 |
| <b>Tabela 4</b> - Linhagens, serovars e complexos clonais que é possível determinar através da técnica de multiplex PCR descrita por Chenal et al (2015).....                                                                                        | 30 |
| <b>Tabela 5</b> - Diferentes serovars de <i>L. monocytogenes</i> e a respetiva tendência para causar infeções no sistema nervoso central (SNC), doença materno fetal (M/N) e bacteremia (Goulet, Jacquet et al. 2006, Liu 2013).....                 | 31 |
| <b>Tabela 6</b> - Microrganismos indicadores do nível de higiene pelo Regulamento (CE) número 1441/2007, <i>C. perfringens</i> bolores e leveduras e respetivas condições de isolamento em laboratório, de acordo com as normas ISO.....             | 37 |
| <b>Tabela 7</b> - Passos para o isolamento de <i>Salmonella</i> spp., meio de cultura utilizado e condições de incubação de acordo com a norma ISO 6579:2002.....                                                                                    | 38 |
| <b>Tabela 8</b> - Microrganismos indicadores para águas de consumo e águas recreacionais com obrigatoriedade de análise pelo Decreto Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto de 2007 e no Decreto Regulamentar n.º 5/97 de 31 de Março respetivamente. .... | 40 |
| <b>Tabela 9</b> - Primers utilizados na reação de multiplex PCR efetuada para determinar a linhagem dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> (Chenal-Francisque, Maury et al. 2015). ....                                                             | 43 |
| <b>Tabela 10</b> - Empresas que fizeram parte do estudo, respetiva localização e área de negócio.....                                                                                                                                                | 51 |
| <b>Tabela 11</b> - Caracterização dos 56 isolados de <i>L. monocytogenes</i> recolhidos entre Novembro de 2016 e Abril de 2017 no laboratório Brito Rocha Lda.....                                                                                   | 52 |

**Tabela 12** - Características de colónias dos microrganismos representados em meio ALOA e respetiva capacidade de fermentação de ramnose..... 55

**Tabela 13** - Resultados obtidos por sequenciação do gene 16S rRNA e multiplex PCR para os 56 isolados de *L. monocytogenes*. ..... 60

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Fig. 1</b> - Mecanismo de infeção de <i>L. monocytogenes</i> após entrada nas células do hospedeiro (Pamer 2004). .....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 29 |
| <b>Fig. 2</b> - Organograma para o isolamento de <i>Salmonella</i> de amostras alimentares de acordo com a norma ISO 6579:2002. ....                                                                                                                                                                                                                                                                             | 38 |
| <b>Fig. 3</b> - (a) Riscado com crescimento de colónias típicas de <i>L. monocytogenes</i> em meio Chromogenic Listeria Agar (ALOA); (b) Resultado positivo (à esquerda) e negativo (à direita) para o teste de fermentação da ramnose (Rhamnose Test, Frilabo). ....                                                                                                                                            | 47 |
| <b>Fig. 4</b> - Riscado com crescimento de colónias típicas de <i>Salmonella</i> sp. em meio XLD agar (colónias pretas, à esquerda) e CHROMagar Salmonella Plus (à direita) .....                                                                                                                                                                                                                                | 48 |
| <b>Fig. 5</b> - Colónias típicas, obtidas pela técnica de filtração por membrana, de a) coliformes (rosa) e <i>E. coli</i> (violeta) em meio Chromocult Coliform Agar; b) <i>Enterococcus</i> em meio Slanetz and Bartley agar; c) <i>C. perfringens</i> em meio TSC agar; d) e e) <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos em meio Mannitol agar e f) <i>P. aeruginosa</i> em meio Pseudomonas agar base. .... | 50 |
| <b>Fig. 6</b> - Morfologia típica de colónias de <i>L. innocua</i> , à esquerda e de <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. ivanovii</i> , à direita, em meio ALOA (Sigma) .....                                                                                                                                                                                                                                        | 55 |
| <b>Fig. 7</b> - Colónias de <i>L. monocytogenes</i> em meio ALOA quando a flora bacteriana secundária é muito elevada (Stessl, Luf et al. 2009, Biolife 2010) .....                                                                                                                                                                                                                                              | 56 |
| <b>Fig. 8</b> - Colónias típicas para <i>Enterococcus</i> sp. (esquerda) e <i>Cellulosimicrobium funkei</i> (direita) em meio ALOA (Angelidis, Kalamaki et al. 2015) .....                                                                                                                                                                                                                                       | 57 |
| <b>Fig. 9</b> - Duplex PCR dos genes lmo 1077 e LMOF2365_2638 dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> , com 334 pb e 194 pb, respetivamente. ....                                                                                                                                                                                                                                                                | 64 |

## Lista de Abreviaturas

AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*

ActA – *Actin-assembly-inducing Protein*

ALOA – *Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti*

BHI - *Brain Heart Infusion*

CC – Complexo Clonal

SNC – Sistema Nervoso Central

DNA - *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DOP – Denominação de Origem Protegida

dNTPS – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

HACCP - *Hazard Analysis Critical Control Point*

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

InIA – Internalina A

InIB – Internalina B

LLO – Listeriolisina

LD – Dose Letal

MKTTn - *Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin*

MLEE - *Multilocus enzyme electrophoresis*

MLST - *Multilocus sequence typing*

RFLP - *Restriction fragment length polymorphism*

rRNA - *Ribosomal Ribonucleic Acid* (Ácido Ribonucleico Ribossomal)

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PLCs – Fosfolipases C

RAPD - *Random Amplification of Polymorphic DNA*

RVS - *Rappaport-Vassiliadis-Soya*

UFC – Unidade formadora de colónia

XLD - *Xylose lysine deoxycholate*

## Capítulo 1 - Introdução

## Análise Microbiológica de Alimentos

Nos últimos anos o aumento das toxi-infeções alimentares tornou-se uma importante preocupação em termos de saúde pública em todo o mundo. A população humana está cada vez mais suscetível a este tipo de doenças, em parte devido às mudanças de estilo de vida, nomeadamente a prática de uma alimentação mais ousada, um maior consumo de alimentos processados e de conveniência, e ainda devido ao escasso tempo dedicado à sua preparação (Meng and Doyle 2002). Para além destes fatores, há ainda a descoberta crescente, nas últimas décadas, de patógenos microbianos, como a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Cryptosporidium parvum* e *Helicobacter pylori*. Outros microrganismos, como *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*, são patógenos há muito reconhecidos, mas que foram apenas associados a doenças alimentares nos anos 80 (Meng and Doyle 1998).

As doenças transmitidas por alimentos podem dividir-se em infeções e intoxicações. O primeiro caso ocorre devido à ingestão de alimentos contaminados por bactérias patogénicas vivas, como são exemplo a *Salmonella* e *Shigella*. Caso estas consigam sobreviver à passagem pelo estômago, multiplicam-se no interior do organismo humano, dando origem aos sintomas de infeção. A intoxicação alimentar ocorre devido à ingestão de alimentos que contenham toxinas produzidas por microrganismos, como a neurotoxina do *Clostridium botulinum* ou a enterotoxina de *Staphylococcus*. Neste caso, o período de incubação da doença é mais reduzido, uma vez que as toxinas iniciam imediatamente o seu efeito tóxico quando no interior do organismo (Viegas 2014). A segurança alimentar surge como um desafio global prioritário, uma vez que os microrganismos contaminantes são cada vez mais resistentes à ação de antibióticos e são capazes de sobreviver a operações de produção e processamento alimentares, representando assim uma potencial ameaça para a saúde humana (Akhtar, Sarker et al. 2014).

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que todos os anos, uma em cada dez pessoas adoece devido à ingestão de alimentos contaminados, resultando na morte de 420.000 indivíduos (WHO 2015). Grande parte das infeções alimentares são causadas pela ingestão de carne, ovos, produtos frescos e laticínios crus ou mal cozinhados, contaminados com novovírus, *Campylobacter*, *Salmonella* e estirpes patogénicas de *E. coli*. As doenças de origem alimentar podem causar sintomas a curto prazo, de náusea, vómitos e diarreia, ou implicações a longo termo, como cancro, insuficiência renal ou hepática e distúrbios cerebrais. As suas consequências são mais

preocupantes e sérias nos chamados grupos de risco, nomeadamente mulheres grávidas, pessoas idosas ou com o sistema imunitário comprometido e especialmente crianças, uma vez que, se não forem fatais, podem deixar graves sequelas como atrasos no desenvolvimento físico e mental, ficando com a sua qualidade de vida comprometida permanentemente (WHO 2015). É, por isso, fundamental a implementação de medidas que visem a melhoria da higiene dos equipamentos e processos de produção de alimentos e o controlo da qualidade destes no final do processo produtivo e antes de chegarem ao consumidor final.

### Microrganismos indicadores do nível de higiene dos processos

O Regulamento (CE) número 1441/2007 estabelece os critérios microbiológicos aplicáveis a géneros alimentícios para certos microrganismos e as regras de execução a cumprir pelos operadores das empresas do sector alimentar. Este regulamento expressa a obrigatoriedade de pesquisa de microrganismos indicadores ao nível de higiene dos processos, nomeadamente o número total de colónias aeróbias, Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva (CE 2007).

Tradicionalmente, os microrganismos indicadores eram utilizados para sugerir a presença de patógenos (Berg 1978). No entanto, compreende-se agora que não há correlação direta entre o número de microrganismos indicadores e o de patógenos (Grabow 1996), pelo que o termo foi dividido em três conceitos: microrganismos indicadores de processo, indicadores fecais e organismos modelo, explicados por Ashbolt et al (2001).

A família das Enterobacteriaceae, bactérias Gram-negativas e não esporulantes, onde se incluem a *Salmonella*, *Yersinia enterocolítica*, *E. coli* e *Shigella* spp., faz parte dos microrganismos indicadores de processo (Baylis C. 2011). Estes são utilizados para evidenciar a falta de higiene na preparação de alimentos, processamento inadequado ou recontaminação após o processamento. A sua ausência em alimentos fornece alguma garantia de que a higiene e processo de manufatura do alimento ocorreu de forma adequada. Pelo contrário, a sua presença indica um potencial problema ou falha no processo de produção que importa corrigir (Baylis C. 2011).

A *E. coli* é uma bactéria ubíqua no trato gastrointestinal de animais mamíferos e aves. Grande parte das estirpes não representam qualquer perigo para a saúde humana, mas algumas delas podem provocar doenças intestinais graves em humanos

(Akhtar, Sarker et al. 2014). A deteção de *E. coli* em alimentos pode ter uma dupla finalidade: esta pode ser considerada como um indicador de contaminação fecal, por ser ubíqua no intestino, ou pode ser classificada como organismo modelo para patógenos entéricos como a *Salmonella* (Baylis C. 2011)

*Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos não esporulantes com uma estrutura colonial em forma de cacho, e com um metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, catalase e coagulase positivos. Estas bactérias fazem parte da microflora humana, e ocorrem preferencialmente na pele e mucosa nasal (WHO 2011). A intoxicação alimentar ocorre por absorção das enterotoxinas produzidas por *S. aureus* e provoca cólicas abdominais, náuseas, vômitos e ocasionalmente diarreia (Le Loir, Baron et al. 2003).

Para além da análise dos critérios microbiológicos indicados no Regulamento (CE) número 1441/2007 de análise obrigatória, muitas unidades industriais de produção alimentar optam também por verificar a presença de outros microrganismos como coliformes, fungos, incluindo bolores e leveduras, ou ainda *Clostridium perfringens*. O grupo dos coliformes inclui uma extensa variedade de bacilos não esporulantes, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-negativos capazes de crescer na presença de concentrações relativamente altas de sais biliares e de fermentar lactose a 35-37 °C em 24h a 48h com produção de ácido e gás (WHO 2011). Historicamente, os coliformes eram o indicador de higiene dos processos mais utilizado pela indústria alimentar, principalmente no setor dos lacticínios. De momento, grande parte dos países, incluindo os pertencentes à União Europeia, evoluíram para a deteção de Enterobacteriaceae, uma vez que não há base taxonómica para os microrganismos designados como coliformes (Baylis C. 2011). *C. perfringens* é um bacilo Gram-positivo, esporulante e anaeróbio, ubíquo no solo e trato gastrointestinal de animais de sangue quente (Brynstad and Granum 2002). Pode provocar intoxicação alimentar do tipo A, que resulta da produção de enterotoxinas no intestino delgado 8 a 24 horas após a ingestão de alimentos contaminados (Brynstad and Granum 2002), ocasionando dor abdominal intensa e diarreia (Le Loir, Baron et al. 2003); ou do tipo C, que ocorre raramente mas que tem consequências mais graves, como enterite necrótica humana (Brynstad and Granum 2002). A determinação da presença de bolores e leveduras é relevante pois a existência de leveduras em alimentos é geralmente resultado da utilização de equipamentos e utensílios mal higienizados, e o crescimento de bolores é um indicador de deterioração, especialmente em produtos com elevada atividade de água. Para além

disso, os bolores podem secretar micotoxinas com atividade teratogénica e carcinogénica (Smith, Daifas et al. 2004).

Apesar de a legislação Portuguesa ser omissa no que se refere aos limites de aceitação para determinados microrganismos em alimentos, existem valores guia para facilitar a interpretação dos resultados obtidos, como os fornecidos pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge para alimentos preparados em estabelecimentos de restauração (Tabela 1). Este instituto estabeleceu quatro níveis de qualidade microbiológica, que vão desde o satisfatório ao inaceitável/potencialmente perigoso, com base nas cerca de 4000 amostras analisadas anualmente nas suas instalações, bem como em referências colhidas de diversos documentos internacionais (INSA 2005).

Tabela 1- Valores guia para avaliação microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração (INSA 2005)

| Microrganismo                             | Qualidade Microbiológica (ufc/g) |                                        |                                   |                                            |
|-------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|
|                                           | Satisfatório                     | Aceitável                              | Não satisfatório                  | Inaceitável/<br>potencialmente<br>perigoso |
| <i>Escherichia coli</i> <sup>1</sup>      | <10                              | NA <sup>2</sup>                        | >10                               | NA                                         |
| <i>Staphylococcus coagulase positivos</i> | <10 <sup>2</sup>                 | NA                                     | ≥10 <sup>2</sup> ≤10 <sup>4</sup> | >10 <sup>4</sup>                           |
| <i>Salmonella spp.</i>                    | Ausente em 25g                   | -                                      | -                                 | Presente em 25g                            |
| <i>Listeria monocytogenes</i>             | Ausente em 25g                   | Presente em 25g<br>(<10 <sup>2</sup> ) | -                                 | ≥10 <sup>2</sup>                           |

<sup>1</sup>Exceto frutos e vegetais crus

<sup>2</sup>NA – não aplicável

### Microrganismos indicadores da segurança dos géneros alimentícios

Para além da pesquisa de microrganismos indicadores do nível de higiene dos processos, o Regulamento (CE) número 1441/2007 prevê a determinação dos critérios de segurança, onde se inclui a pesquisa de microrganismos patogénicos como *Salmonella spp.* e *L. monocytogenes* (CE 2007).

*Salmonella* spp. são bactérias entéricas Gram-negativas, geralmente encontradas em produtos provenientes de aves de capoeira, como os ovos, mas que podem ser isoladas de uma grande variedade de alimentos, nomeadamente carne de porco, leite, lacticínios, frutas e vegetais (Akhtar, Sarker et al. 2014). A espécie *Salmonella enterica* é um dos patogénicos alimentares mais prevalentes, causando cerca de 11% das mortes relacionadas com doenças alimentares (Ronholm, Nasheri et al. 2016), sendo que a *S. enteritidis* e a *S. Typhimurium* constituem as duas serovars mais reportadas em casos de salmonelose em humanos (EFSA 2016). As principais consequências da infeção por *Salmonella* são a enterocolite ou gastroenterite com dor abdominal, febre, e diarreia, febre entérica, bacteremia e, em casos extremos, morte (Bryan and Doyle 1995)

*L. monocytogenes* são bactérias Gram-positivas em forma de bastonete cujos principais veículos de transmissão são o leite, queijo pasteurizado e não pasteurizado, vegetais, produtos à base de carne e refeições prontas a comer (Bryan and Doyle 1995, Zhang, Yeh et al. 2007, Clauss and Lorber 2008). A infeção por *L. monocytogenes* pode ter implicações clínicas graves, como a bacteremia invasiva, meningoencefalite, aborto espontâneo em grávidas e potencialmente a morte (Ronholm, Nasheri et al. 2016).

## Análise Microbiológica de Águas

Apesar do desenvolvimento observado nas últimas décadas, há ainda uma proporção significativa da população mundial que não tem acesso a abastecimento de água e infraestruturas apropriadas de saneamento (Haller, Hutton et al. 2007). De fato, cerca de um sexto da população mundial, i.e. um total de 1,1 biliões de pessoas, não possui acesso a água potável (UNICEF 2006), sendo que aproximadamente 1,7 milhões de mortes por ano são atribuídas ao consumo de água imprópria e à falta de higiene e saneamento básico, tendo como principal causa a diarreia infecciosa. Dessas, 90 % ocorrem em crianças com idade inferior a 5 anos (WHO 2002).

O acesso a água potável é um direito humano básico essencial para a manutenção de um bom estado de saúde, e uma componente incontornável para uma política eficaz de saúde pública (WHO 2008). Neste sentido, não surpreende que haja um controlo apertado da qualidade da água para consumo humano, com uma frequência de amostragem adequada à população servida e a rápida comunicação dos

incumprimentos de valores paramétricos que comportem risco para a saúde humana (Ministério do Ambiente 2007).

### Águas de consumo

De um modo geral, os maiores riscos em termos microbiológicos em águas de consumo estão relacionados com a contaminação fecal por humanos ou animais, associada à presença de bactérias patogénicas (WHO 2011). Para as águas de consumo, segundo o Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto de 2007, é obrigatória a análise à presença de coliformes totais e termotolerantes (*E. coli*), *Enterococcus* intestinais e *C. perfringens*, cujos valores paramétricos estão representados na Tabela 2 (Ministério do Ambiente 2007).

Tabela 2 - Valores paramétricos para a água destinada a consumo humano fornecida por redes de distribuição e fontes ou reservatórios não ligados à rede de distribuição (Ministério do Ambiente 2007)

| Parâmetro                       | Valor paramétrico     | Unidade    |
|---------------------------------|-----------------------|------------|
| Microrganismos totais a 22 °C   | Sem alteração anormal | ufc/mL     |
| Microrganismos totais a 37 °C   | Sem alteração anormal | ufc/mL     |
| Coliformes totais               | 0                     | ufc/100 mL |
| <i>Escherichia coli</i>         | 0                     | ufc/100 mL |
| <i>Enterococcus</i> intestinais | 0                     | ufc/100 mL |
| <i>Clostridium perfringens</i>  | 0                     | ufc/100 mL |

Os coliformes totais conseguem crescer em ambientes aquáticos, pelo que não são bons indicadores de contaminação fecal. Estes são geralmente considerados indicadores de limpeza e integridade do sistema de distribuição e a sua presença pode apontar a potencial formação de biofilmes (WHO 2011). O subgrupo de coliformes termotolerantes, composto predominantemente por *E.coli*, compreende os coliformes com capacidade de fermentar lactose à temperatura de 44,5 °C em 24h (WHO 2001).

Este grupo é considerado o indicador mais adequado de contaminação fecal (WHO 2011).

As espécies *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* and *E. hirae* pertencem ao subgrupo de bactérias Gram-positivas designadas por *Enterococcus* intestinais. Estas são relativamente específicas para poluição fecal, apesar de poderem ocasionalmente ser isoladas de outros ambientes como o solo (WHO 2011). *C. perfringens* é um indicador de contaminação fecal, geralmente intermitente, altamente específico (WHO 2011).

### Águas recreacionais

As águas recreacionais, incluindo as águas de piscinas e *jacuzzis*, devem ser monitorizadas com uma frequência mínima de amostragem quinzenal e devem respeitar os parâmetros descritos na Tabela 3. Para avaliar a qualidade microbiana deste tipo de águas deve ser analisada a presença de microrganismos totais a 37 °C, coliformes totais e termotolerantes, *Enterococcus* intestinais, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Pseudomonas aeruginosa*, como indicado no Decreto Regulamentar n.º 5/97 de 31 de Março (Ministério do Ambiente 1997).

Tabela 3 - Valores paramétricos para águas pertencentes a espaços para atividades aquáticas como piscinas, lagoas ou *jacuzzi* (Ministério do Ambiente 1997).

| Parâmetro                                 | Valor paramétrico | Unidade                        |
|-------------------------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Microrganismos totais a 37 °C             | 100               | ufc/mL                         |
| Coliformes totais                         | 10                | ufc/100 mL                     |
| <i>Escherichia coli</i>                   | 0                 | ufc/100 mL                     |
| <i>Enterococcus</i> intestinais           | 0                 | ufc/100 mL                     |
| <i>Staphylococcus</i> coagulase positivos | 0                 | ufc/100 mL em 90% das amostras |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>             | 0                 | ufc/ 100 mL                    |

*P. aeruginosa* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios e não-esporulantes, com distribuição ubíqua em águas, vegetação e solo. O ambiente quente e húmido gerado em piscinas e locais semelhantes possui as condições ideais ao seu crescimento (WHO 2006). As bactérias desta espécie estão associadas a infeções de injúrias como queimaduras ou aberturas cirúrgicas e colonização do trato respiratório ou olhos de pessoas suscetíveis, podendo em casos extremos provocar septicémia ou meningite (WHO 2011).

*S. aureus*, já caracterizados anteriormente como microrganismos indicadores do nível de higiene em alimentos, são também bactérias com pesquisa obrigatória em águas recreacionais. Estas fazem parte da microflora humana, e estão presentes maioritariamente na pele e mucosa nasal (WHO 2011). A presença destes microrganismos em piscinas pode provocar erupções cutâneas, infeção de feridas, infeções do trato urinário, otites, entre outros (WHO 2006).

### Caracterização de isolados de *L. monocytogenes*

O género *Listeria* é um grupo de bactérias Gram-positivas, não esporulantes em forma de bastonetes com dimensões de 0,4–0,5 µm × 1–1,5 µm. O género *Listeria* pertence à família Listeriaceae, ordem Bacillales, classe Bacilli, filo Firmicutes, domínio Bacteria. Das 10 espécies identificadas até à data, *L. monocytogenes* é um patógeno intracelular facultativo, *L. ivanovii* infecta maioritariamente animais roedores, sendo as restantes espécies - *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii* e *L. weihenstephanensis* - essencialmente saprófitos (Liu 2013).

A *L. monocytogenes* é a espécie de *Listeria* mais comumente associada a doença, quer em humanos quer em animais. É uma bactéria ubíqua, descrita originalmente por Murray e Pirie (Murray, Webb et al. 1926, Pirie 1940), que possui a capacidade de se multiplicar em habitats muito diversos e é capaz de sobreviver em condições adversas por longos períodos de tempo (Ivanek, Grohn et al. 2006). Sendo um patógeno saprófito facultativo, pode ser isolado do solo, águas, animais, humanos e alimentos crus e processados. Uma vez que entra no hospedeiro pode causar doença invasiva severa em humanos e numa grande diversidade de animais (Orsi, den Bakker et al. 2011).

### Persistência da *L. monocytogenes* em alimentos

A *L. monocytogenes* pode ser introduzida em instalações de processamento alimentar através das matérias primas, ingredientes, água, manipuladores ou equipamentos (Wenger, Swaminathan et al. 1990, Autio, Hielm et al. 1999, Møretrø 2004, Almeida, Magalhaes et al. 2013, Cartwright, Jackson et al. 2013). Fortes evidências sugerem que a persistência de *L. monocytogenes* em instalações de processamento de alimentos durante anos ou mesmo décadas, é um fator muito importante na transmissão de patógenos alimentares e na origem de surtos de listeriose. A persistência da bactéria em outros ambientes, como quintas ou locais de venda a retalho, pode também contribuir para a contaminação dos alimentos e para a sua transmissão a humanos (Johansson, Rantala et al. 1999, Saunders, Mangione et al. 2004, Ferreira, Wiedmann et al. 2014).

A persistência é utilizada para descrever a sobrevivência sem crescimento a longo termo de *L. monocytogenes* num alimento, dentro do organismo humano ou em determinado tipo de ambientes (Ferreira, Wiedmann et al. 2014) e é definida pelo isolamento repetido de *L. monocytogenes* em diferentes períodos de tempo, que são subsequentemente identificadas como subtipos idênticos, através de métodos genotípicos e/ou fenotípicos. Alguns subtipos de *L. monocytogenes* são relativamente comuns e amplamente distribuídos, enquanto que outros são apenas isolados esporadicamente. O isolamento de um subtipo comum da bactéria em várias amostras de diferente origem fornece fraca evidência de persistência quando comparada com o isolamento de um subtipo raro em múltiplas fontes (Johansson, Rantala et al. 1999, Ferreira, Wiedmann et al. 2014).

A diferenciação entre a introdução repetida de um subtipo específico de *L. monocytogenes* numa instalação ou a sua persistência nessas mesmas instalações, é muitas vezes difícil de conseguir apenas através da tipagem dos isolados. É geralmente necessário recolher informação acerca da organização e design das instalações. Como exemplo, o isolamento repetido do mesmo subtipo de patógeno numa empresa que utilize apenas ingredientes *pathogen-free* e cujo ambiente seja separado dos espaços circundantes (com boa construção e implementação de boas práticas de produção) é um provável indicativo de persistência. Em contraste, o isolamento repetido do mesmo patógeno em diferentes períodos de tempo e em instalações com fracas medidas de prevenção contra a reintrodução de *L. monocytogenes* através de matérias primas ou ambientes vizinhos, pode indicar quer persistência quer reintrodução do patógeno no

local (Thimothe, Nightingale et al. 2004, Ferreira, Wiedmann et al. 2014, Vangay, Steingrimsson et al. 2014, Stasiewicz, Oliver et al. 2015).

Em 2011, Ferreira et al. recolheram 1723 isolados de *L. monocytogenes* a partir de enchidos como alheira e salpicão de vinhais. O objetivo foi avaliar a diversidade genética dos isolados, os mecanismos de contaminação e identificar características genéticas e fenotípicas dos isolados considerados como persistentes. Os 1723 isolados, de 11 processadores diferentes, foram recolhidos durante 10 a 32 meses e foram analisados por *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Os padrões de persistência mostraram que três dos processadores teriam apenas um clone persistente nos produtos e que outros dois processadores possuíam dois clones persistentes. Para além disso, o mesmo clone terá sido detetado e avaliado como persistente em dois processadores diferentes (Ferreira, Barbosa et al. 2011).

Num estudo similar levado a cabo em 2011 foram analisados mensalmente durante um período de 2 anos um total de 1591 amostras recolhidas em 16 instalações de produção de queijo. Do total de amostras recolhidas, 250 (16%) obtiveram um resultado positivo para a presença de *L. monocytogenes*, confirmado posteriormente por PCR. Das 16 instalações que participaram no estudo, apenas em três não foi detetada *L. monocytogenes*, sendo que em 10 das instalações a bactéria foi detetada mais que uma vez (Fox, Hunt et al. 2011).

### Quadro clínico da Listeriose

A população humana é altamente diversa no que diz respeito à resposta a agentes infecciosos, refletindo a grande diversidade em termos genéticos, estado nutricional, idade, condição do sistema imunitário, níveis de stress, exposição prévia a agentes infecciosos, entre muitos outros. Há segmentos da população com risco mais elevado, segmentos esses que têm geralmente a capacidade imunitária mais fragilizada (Wolf, Cole et al. 1994, Buchanan, Smith et al. 2000, Simpson, Lowder et al. 2012, Friesema, Kuiling et al. 2015). Para além da suscetibilidade do hospedeiro, o quadro clínico da listeriose varia de acordo com a dimensão do inóculo ingerido e a estirpe de *L. monocytogenes* envolvida (Temple and Nahata 2000).

Os indícios de infeção em indivíduos saudáveis incluem sintomas não específicos similares aos de gripe, náuseas, vômitos, cólicas, diarreia e febre (Skogberg, Syrjänen et al. 1992, Ooi and Lorber 2005, Bortolussi 2008). Em alguns casos pode

ocorrer a manifestação de sintomas mais graves como infeção focal (dos olhos, pele, válvulas cardíacas, fígado, entre outros), e infeções no sistema nervoso central como meningite e septicemia (Doganay 2003, Ooi and Lorber 2005, Clauss and Lorber 2008, Almeida 2009). Os sintomas podem desenvolver-se entre 1 e 67 dias após a ingestão do alimento contaminado (Goulet, King et al. 2013).

Para certos grupos, incluindo grávidas, neonatos, idosos e indivíduos imunossuprimidos, uma infeção por *L. monocytogenes* é particularmente grave (Doganay 2003, Clauss and Lorber 2008, Almeida 2009, Silk 2013).

Em jovens e adultos, a maior parte dos casos de listeriose ocorre em indivíduos imunocomprometidos ou imunossuprimidos, como pacientes que recebem terapia citotóxica ou com esteroides, transplantes, hemodiálise, que possuam neoplasmas malignos, problemas de alcoolismo ou doença hepática alcoólica, sejam diabéticos, portadores do HIV ou toxicodependentes (Stelma, Reyes et al. 1987, Siegman-Igra, Levin et al. 2002, Amaya-Villar, Garcia-Cabrera et al. 2010, Barocci, Mancini et al. 2015). Os sintomas são similares aos descritos para a população em geral, com destaque para a manifestação de um estado mental alterado, disfunção cerebral e convulsões (Brouwer, Beek et al. 2006, Amaya-Villar, Garcia-Cabrera et al. 2010).

Cerca de 50% dos casos de listeriose ocorrem em indivíduos idosos (Bortolussi 2008), nos quais a infeção por *L. monocytogenes* está associada a uma maior severidade das sequelas neurológicas. Indivíduos nesta faixa etária, possuem muitas vezes condições subjacentes como diabetes, problemas renais ou um sistema imunitário menos eficiente, que contribuem para a alta taxa de mortalidade e para o agravamento das consequências da infeção (Ben-Yehuda and Weksler 1992, Van de Beek, de Gans et al. 2004, Weisfelt, van de Beek et al. 2006, Cabellos, Verdaguer et al. 2009, Dzupova, Rozsypal et al. 2013, Pagliano, Attanasio et al. 2015).

Em grávidas, uma infeção por *L. monocytogenes* provoca geralmente sintomas leves, similares aos de uma gripe ligeira. Há, no entanto, um risco acrescido da ocorrência de aborto espontâneo durante o primeiro trimestre da gravidez, ou de parto prematuro quando expostas à bactéria no final da gestação, com o nascimento de uma criança com septicémia aguda (Farber and Peterkin 1991, Mylonakis, Paliou et al. 2002, Doganay 2003, Bortolussi 2008). Em bebés neonatos, com menos de um mês de vida, a doença pode ocorrer *early-onset*, nos primeiros sete dias de vida ou *late-onset*, a partir de sete dias de vida. No primeiro caso o diagnóstico ocorre geralmente nas primeiras vinte e quatro horas após o parto, manifestando-se principalmente na forma de

septicémia, dificuldade respiratória ou pneumonia. O parto é geralmente prematuro, e a doença é transmitida pela mãe através da placenta. Estes casos apresentam a taxa de mortalidade mais elevada compreendida entre 25% e 50% (Bortolussi 2008, Clauss and Lorber 2008, Lamont, Sobel et al. 2011). Nas infeções *late-onset* a transmissão ocorre após o nascimento, possivelmente através de contaminação cruzada nos hospitais. Os sintomas incluem irritabilidade, febre e dificuldades na alimentação (Nelson, Warren et al. 1985, Mylonakis, Paliou et al. 2002, Bortolussi 2008, Sahu, Rahamathulla et al. 2012).

### Dose infecciosa mínima

A relação dose-resposta para a infeção por *L. monocytogenes* não é ainda bem compreendida, uma vez que a resposta da população humana à sua exposição é altamente variável (Buchanan, Smith et al. 2000). Há, no entanto, estudos que descrevem que a probabilidade de cada individuo ficar doente após exposição a este patógeno é essencialmente dependente da interação entre três fatores: hospedeiro, patógeno e matriz alimentar (Buchanan, Smith et al. 2000, FAO/WHO 2003, FDA/FSIS 2003, Rocourt, BenEmbarek et al. 2003, Pouillot, Hoelzer et al. 2015, Buchanan, Gorris et al. 2017).

A matriz alimentar foi durante muito tempo considerada como um veículo neutro para a proliferação do patógeno, com pouco impacto na relação dose-resposta. Nas últimas décadas demonstrou-se que esta pode ter uma influência significativa, principalmente ao nível do impacto que a adaptação ácida pode ter na resistência dos patógenos entéricos (O'Driscoll, Gahan et al. 1996, Buchanan, Smith et al. 2000, Pouillot, Hoelzer et al. 2015). Por exemplo, um alimento que aumente o pH do estômago, reduza a exposição do microrganismo à acidez gástrica, ou o tempo de trânsito através do estômago, irá diminuir a eficácia da acidez gástrica como barreira contra a entrada de um patógeno de origem alimentar (Buchanan, Smith et al. 2000). Assim, o consumo de alimentos com efeito tampão pode levar ao aumento da dose necessária para causar infeção. Por outro lado, pensa-se que a ingestão de alimentos surfactantes ou com alto teor em gordura, podem proteger as células bacterianas do contacto com o ácido gástrico, diminuindo assim o número de células necessárias para causar infeção (FDA/FSIS 2003, McLauchlin, Mitchell et al. 2004, Pouillot, Hoelzer et al. 2015). No que concerne ao hospedeiro, os fatores que o tornam mais ou menos suscetível a infeção por *L. monocytogenes* foram já enumerados.

Relativamente ao patógeno, a existência de diferentes subtipos da bactéria com virulência e capacidade de adaptação distintos, tornam difícil a determinação de um valor unânime para a dose mínima necessária à ocorrência de infeção por *L. monocytogenes* (Chen, Ross et al. 2006). Para além disso, a suscetibilidade de infeção por diferentes estirpes de *L. monocytogenes* pode apenas ser estudada através de modelos animais, testes *in vitro* (presença e caracterização de genes associados com a virulência), ou através de estudos epidemiológicos, uma vez que a realização de ensaios clínicos em humanos para este fim não é possível (FDA/FSIS 2003, McLauchlin, Mitchell et al. 2004).

Apesar da falta de dados para a determinação da dose mínima para infeção, há estudos, como os de Farber et al. (1991) e Miettinen et al. (1990), realizados em primatas não humanas e em cabras, respetivamente, que afirmam que a dose mínima para infeção é cerca de  $10^9$  ufc (Miettinen, Husu et al. 1990, Farber, Daley et al. 1991). No entanto, na literatura são descritos valores para a  $LD_{50}$ , que vão desde  $1,0 \times 10^{6,5}$  ufc a  $7,0 \times 10^{10}$  ufc (Pine, Malcolm et al. 1990, Notermans and Hoornstra 2000, WHO/FAO 2004, Smith, Takeuchi et al. 2008, Buchanan, Gorris et al. 2017). Apesar das dificuldades que a pesquisa acerca da relação dose-resposta para *L. monocytogenes* acarreta, é já possível tirar algumas conclusões. Ao contrário do que acontece com outros microrganismos, como a *Salmonella*, a *L. monocytogenes* é caracterizada por possuir uma probabilidade de infeção muito baixa em indivíduos saudáveis para doses de exposição baixas i.e.  $10^2$  ufc/g (Chen, Ross et al. 2003, Lianou and Sofos 2007, Pouillot, Hoelzer et al. 2015). Relativamente à ação da bactéria em grávidas, num estudo levado a cabo em primatas foi concluído ser necessária uma quantidade de *L. monocytogenes* entre  $3,7 \times 10^{10}$  ufc e  $7,2 \times 10^{10}$  ufc para provocar aborto (Smith, Takeuchi et al. 2003).

Os resultados obtidos em modelos animais colocam muitas limitações na extrapolação para a realidade humana. Como a suscetibilidade para contrair listeriose é baixa, o estudo em modelos animais requer geralmente um grande número de indivíduos para que apenas uma pequena porção desenvolva sintomas clínicos da doença. Outra dificuldade deste género de estudos, está relacionada com o método de infeção empregue: em grande parte dos modelos experimentais a infeção é feita por via intravenosa ou intraperitoneal, e não através do sistema gastrointestinal (Chen, Ross et al. 2003, McLauchlin, Mitchell et al. 2004).

### Mecanismo de infeção

O principal mecanismo de infeção por *L. monocytogenes* envolve a ingestão de um alimento contaminado e passagem do patógeno através do estômago e da barreira gastrointestinal, a partir de onde ocorre a propagação da bactéria para o sangue (Orsi, den Bakker et al. 2011). O processo de infeção requer interação entre a internalina A (InlA), expressa na superfície celular da bactéria, e a E-caderina, uma glicoproteína membranar expressa na superfície das células epiteliais (Pamer 2004). Este fato leva a que a eficiência com que as células epiteliais intestinais são infetadas seja variável de acordo com as diferenças na sequência de aminoácidos da E-caderina em cada espécie. Por exemplo, os ratos são relativamente resistentes a infeções intestinais por *L. monocytogenes* devido à diferença de um único aminoácido relativamente à E-caderina humana (Lecuit, Vandormael-Pournin et al. 2001). Quando presente na corrente sanguínea, a bactéria chega a órgãos como os nódulos linfáticos, baço e o fígado (Orsi, den Bakker et al. 2011). Já no fígado, a *L. monocytogenes* entra nos hepatócitos através da expressão de uma proteína de superfície, a internalina B (InlB), que se liga ao fator de crescimento hepático presente na superfície dos hepatócitos (Pamer 2004). Após a entrada na célula hepática, a bactéria escapa à ação do fagossoma pela destruição da sua membrana através da secreção de um fator de virulência, a listeriolisina O (LLO). Para além da LLO a *L. monocytogenes* secreta duas fosfolipases C (PLCs) que contribuem também para a sua sobrevivência à ação do fagossoma. A invasão do citoplasma desencadeia uma resposta inflamatória inata e induz imunidade protetora (Pamer 2004).

Logo após a entrada no citoplasma, a bactéria induz a polimerização de filamentos de actina do hospedeiro e utiliza-os para se mover, primeiro no citoplasma e depois de célula para célula, facilitando assim o processo de proliferação da infeção. A proteína bacteriana *actin-assembly-inducing* (ActA) é a responsável pela mediação da nucleação da actina, pois possui múltiplos locais de ligação para os componentes do citoesqueleto, servindo assim como base para aglomerar os componentes necessários para que ocorra a polimerização de actina na célula (Portnoy, Auerbuch et al. 2002). O processo de infeção pela *L. monocytogenes* está exemplificado na Figura 1.

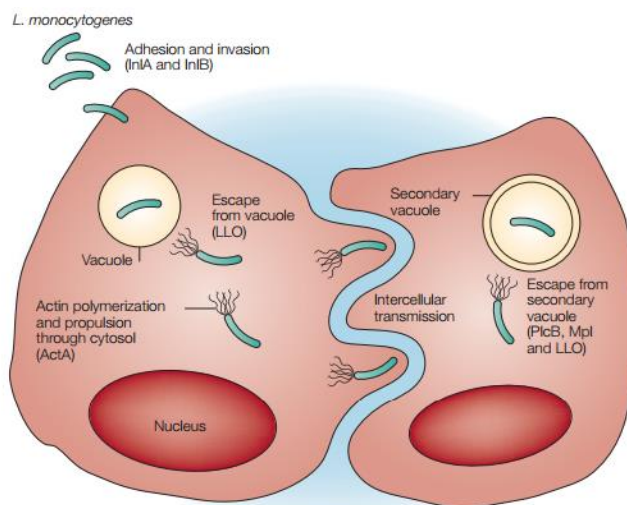


Fig. 1 - Mecanismo de infecção de *L. monocytogenes* após entrada nas células do hospedeiro (Pamer 2004).

Em indivíduos saudáveis, a maior parte das células de *L. monocytogenes* que atravessam a barreira gastrointestinal são removidas da corrente sanguínea por macrófagos podendo, contudo, ocorrer alguma proliferação bacteriana no fígado, que é geralmente eliminada com facilidade. Pelo contrário, em indivíduos imunocomprometidos, a proliferação descontrolada da bactéria no fígado provoca a sua libertação para a circulação sanguínea, podendo levar à invasão do conteúdo uterino e do sistema nervoso central, com consequências sérias para a saúde do indivíduo e do feto (Orsi, den Bakker et al. 2011).

### Métodos para a tipagem de serovars de *L. monocytogenes*

Podem ser utilizadas duas abordagens para a determinação da linhagem de determinado isolado de *L. monocytogenes*: fenotípica ou genética.

A serotipagem, tipagem fágica e a MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) são alguns dos métodos utilizados na abordagem fenotípica. Os métodos genéticos incluem PFGE (*pulsed-field gel electrophoresis*); ribotipagem; técnicas de tipagem baseadas em PCR (RAPD, AFLP, PCR-RFLP); e técnicas de genotipagem por sequenciação, como o MLST (*multilocus sequence typing*) (Liu 2013).

Chenal-Francisque et al (2015) desenvolveram um método rápido para a identificação dos principais clones de *L. monocytogenes* através de multiplex PCR. Esta ferramenta é uma alternativa rápida e eficiente à identificação por MLST, que é um método mais demorado e dispendioso. Os isolados de *L. monocytogenes* a partir de amostras clínicas de humanos e alimentos, pertencem predominantemente a duas linhagens: I e II. Este método de multiplex PCR permite, num primeiro passo, determinar a qual dessas linhagens os isolados pertencem. Posteriormente, pretendendo-se fazer uma caracterização mais detalhada dos clones de *L. monocytogenes*, pode-se recorrer a um conjunto de primers específicos, para distinguir por multiplex PCR os serovars IIa, IIc, IIb, e IVb, e os complexos clonais CC1, CC2, CC3, CC4, CC5, CC6, CC7, CC8, CC9, CC121 e CC155 (Tabela 4) (Chenal-Francisque, Maury et al. 2015).

Tabela 4 - Linhagens, serovars e complexos clonais que é possível determinar através da técnica de multiplex PCR descrita por Chenal et al (2015) (Chenal-Francisque, Maury et al. 2015).

| Linhagem | Serogrupos | Complexos clonais      |
|----------|------------|------------------------|
| I        | Ivb        | CC1, CC2, CC4, CC6     |
|          | IIb        | CC3, CC5               |
| II       | IIa        | CC7, CC8, CC121, CC155 |
|          | IIc        | CC9                    |

#### Patogenicidade de diferentes serovars de *L. monocytogenes*

Considerando as suas similaridades morfológicas e biológicas e variação da sua patogenicidade, é importante distinguir corretamente as estirpes/serovars de *Listeria* patogénicas e não-patogénicas. A serotipagem com base em reações entre antígenos somáticos (O) ou flagelares (H) e anticorpos específicos, representa um dos métodos utilizados para identificar clones de *Listeria* com diferente patogenicidade. Através de métodos de serotipagem é possível identificar treze serovars para a *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), uma para *L. ivanovii* (5), três para *L. innocua* (1/2b, 6a e 6b), três para *L. welshimeri* (1/2b, 6a e 6b), seis para *L. seeligeri* (1/2a, 1/2b, 3b, 4a, 4b, 4c e 6b) e uma para *L. grayi* (Grayi) (Liu 2013).

A determinação dos vários serovars de *L. monocytogenes* tem importantes implicações clínicas, pois a infeção por diferentes serovars tem consequências distintas. A serovar 4b é a principal responsável por listeriose humana endémica, sendo frequentemente isolada a partir de infeções do sistema nervoso central. As serovars 1/2a, 1/2b e 1/2c, são responsáveis por casos de listeriose humana esporádicos. O conjunto das 4 serovars referidas é responsável por 98% dos isolados obtidos através de casos clínicos de listeriose (Goulet, Jacquet et al. 2006).

No trabalho de Goulet et al (2006), das 603 amostras de *L. monocytogenes* recolhidas, cerca de metade pertenciam à serovar 4b, sendo que a maior parte terá sido isolada de doentes com infeção do sistema nervoso central. As serovars 1/2a e 1/2c foram isoladas em grande parte de doentes com sintomas de bacteremia, enquanto que apenas o serovar 1/2b surge associado a pacientes com doença materno fetal. As serovars 3a e 3b, apesar de mais raras, já foram isoladas em doentes com bacteremia (Tabela 5) (Goulet, Jacquet et al. 2006, Liu 2013).

Tabela 5 - Diferentes serovars de *L. monocytogenes* e a respetiva tendência para causar infeções no sistema nervoso central (SNC), doença materno fetal (M/N) e bacteremia (Goulet, Jacquet et al. 2006, Liu 2013).

| Serovar | Isolados (%) | Tendência para causar                   |
|---------|--------------|-----------------------------------------|
| 4b      | 49%          | Infeções SNC>Doenças M/N>Bacteremia     |
| 1/2 a   | 27%          | Bacteremia > Doenças M/N > Infeções SNC |
| 1/2 b   | 20%          | Doenças M/N > Bacteremia > Infeções SNC |
| 1/2 c   | 4%           | Bacteremia > Infeções SNC>Doenças M/N   |
| 3a/3b   | <1%          | Bacteremia                              |

Abreviações : Doença M/N – Doença materna/neonatal ; Infeções SNC – infeção no sistema nervoso central

Apesar da importância da serotipagem na caracterização de isolados de *L. monocytogenes*, a existência de antígenos iguais em diferentes clones de *Listeria* torna esta técnica pouco específica (Liu 2013). Como consequência, foram desenvolvidas técnicas de genotipagem para facilitar a sua caracterização infrassubspecífica, o que permitiu a divisão das estirpes de *L. monocytogenes* em 4 linhagens (I, II, III, IV) (Liu 2013). A linhagem I engloba os serovars 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e e está principalmente

associada com a listeriose epidémica (Ward, Ducey et al. 2008). A linhagem II inclui os serovars 1/2a, 1/2c, 3a e 3c, e a linhagem III os serovars 4a e 4c. A linhagem III pode ainda ser dividida em subgrupos: IIIA (serovars típicas, ramnose positivas e avirulentas - 4a e 4c); IIIC (serovar atípica, ramnose positiva virulenta – 4c); e o subgrupo IIIB, que representa um grupo distinto e que foi por isso designado por linhagem IV. Esta é composta por estirpes de serovar 7 e serovars atípicas ramnose negativa e virulentas, que não pertençam ao serovar 4a e 4c (Liu 2013). Como já foi referido, a maior parte dos isolados de *L. monocytogenes* pertencem às linhagens I e II, que contêm as serovars mais comumente associados a casos clínicos de listeriose, incluindo a serovar 1/2a, da linhagem II e os serovars 1/2b e 4b, da linhagem I (Orsi, den Bakker et al. 2011). A grande maioria dos surtos de listeriose em humanos está associada à linhagem I (serovar 4b), sendo que existem também casos relacionados com a presença dos serovars 1/2a e 1/2b (Orsi, den Bakker et al. 2011). A linhagem II é essencialmente relacionada com alimentos prontos a comer e causa geralmente casos de listeriose esporádica em humanos (Ward, Ducey et al. 2008).

Apesar de raro, isolados da linhagem III são ocasionalmente encontrados em casos clínicos de infeção por *L. monocytogenes*, ainda que estes nunca tenham sido associados a surtos de listeriose. Isolados desta linhagem são geralmente associados a casos de listeriose em animais e são isolados muito esporadicamente de alimentos ou instalações de processamento de alimentos. Isolados da linhagem IV são provenientes de ambientes variados como alimentos, humanos ou animais (Orsi, den Bakker et al. 2011). A baixa frequência com que microrganismos das linhagens III e IV são isolados de casos de listeriose humana, pode ser explicada pelo fato de estas linhagens apresentarem pouca prevalência em amostras alimentares. Assim, a exposição humana às estirpes que pertencem a essas duas linhagens será baixa, levando a um baixo número de infeções. Esta situação pode estar relacionada com o fato dos isolados das linhagens III e IV estarem menos adaptados ao stress que existe nos alimentos e ambientes de produção alimentar (Ward, Ducey et al. 2008).

Apesar de grande parte dos casos de listeriose serem causados pelo serovar 4b, a sua prevalência nos alimentos é relativamente baixa, pelo que se pode supor que este possui maior patogenicidade que os restantes serovars (Orsi, den Bakker et al. 2011).

### Dados epidemiológicos

No ano de 2015, na União Europeia, foram confirmados 2206 casos de listeriose, o que equivale a cerca de 0,46 casos da doença por 100000 indivíduos (EFSA 2016). Apesar da incidência da listeriose humana ser baixa comparativamente a outras infeções de origem alimentar, esta tem associada uma elevada taxa de mortalidade, levando a que estes microrganismos estejam entre as principais causas de morte devido a infeções de origem alimentar em países industrializados. Dos 2206 casos confirmados na União Europeia em 2015, 270 acabaram por ser fatais, levando a que a taxa e mortalidade atinja valores de 17,7 % (EFSA 2016). Cerca de 97% dos casos de listeriose detetados na EU levaram à hospitalização, sendo que mesmo tendo sobrevivido à infeção, os pacientes podem desenvolver sequelas graves a longo prazo, principalmente aqueles a quem a bactéria invadiu o sistema nervoso central (McLauchlin, Mitchell et al. 2004). As consequências associadas à meningite por *L. monocytogenes* incluem hemiparesia, a paralisia parcial de um lado do corpo ou paralisia de nervos cranianos (Clauss and Lorber 2008).

Em Portugal o sistema de vigilância para casos de listeriose foi apenas implementado em 2015, pelo que não existem dados acerca dos casos existentes em anos anteriores. Nesse ano, foram reportados e confirmados 28 casos, com uma taxa de incidência de 0,27 casos por 100000 indivíduos, significativamente abaixo da média da União Europeia. O mesmo estudo, realizado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar em cooperação com o Centro Europeu para o Controlo e Prevenção de Doenças, concluiu que as infeções por *L. monocytogenes* ocorreram com maior frequência em indivíduos com mais de 64 anos, sendo esse incremento particularmente evidente a partir dos 84 anos (EFSA 2016).

## Objetivos

O estágio teve como objetivo a familiarização com a rotina de trabalho de um laboratório de ensaio acreditado para a análise de águas e alimentos, desde a recolha e preparação de amostras, à cultura em meios seletivos e diferenciais para a identificação presuntiva de microrganismos alvo, e respetivos testes confirmatórios, à luz das diretivas comunitárias e legislação em vigor.

Adicionalmente, pretendeu-se explorar numa perspetiva de inovação a mais valia da caracterização molecular e genotipagem de isolados de *L. monocytogenes*. De fato, o conhecimento da origem de *L. monocytogenes* isolada de amostras alimentares, não sendo obrigatório e portanto, negligenciado, é importante para a implementação de programas de controlo sanitário orientados para compreender se as contaminações correspondem a genótipos persistentes ou novos, permitindo uma seleção mais cuidada das matérias primas e/ou higienização mais eficaz dos equipamentos e das instalações.

## Capítulo 2 - Materiais e Métodos

## Controlo da qualidade microbiológica de alimentos

### Preparação de amostras

A preparação das amostras de alimentos para análise foi realizada de acordo com as normas ISO 6887-2:2017 (carnes e produtos lácteos), ISO 6887-3:2017 (peixe e produtos à base de peixe), ISO 6887-5:2010 (leite e produtos lácteos) e ISO 6887-4:2017 para outros produtos. A preparação da suspensão inicial e das diluições foram executadas de acordo com a norma ISO 6887-1:2017.

Na Tabela 6 estão descritas as condições para o isolamento em laboratório de Enterobacteriaceae, coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *C. perfringens*, bolores e leveduras

### Isolamento e deteção de *Salmonella* spp.

O isolamento de *Salmonella* spp. compreende 4 passos, nomeadamente um passo de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento e identificação e confirmação. O método utilizado para o isolamento está descrito na norma ISO 6579:2002 (Tabela 7) e representado na Figura 2.

### Isolamento e deteção de *L. monocytogenes*

Para a deteção de *L. monocytogenes* em alimentos, preparou-se uma suspensão com 25 g de alimentos e ~ 225 g de meio ONE Broth-Listeria (Oxoid) e incubou-se a  $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$  durante  $(48 \pm 2)$  h. Em seguida, retirou-se uma ansada da cultura e incubou-se em meio ALOA - Chromogenic Listeria Agar (Oxoid), a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  durante  $(24 \pm 2)$  h. Após incubação as placas foram analisadas para detetar a presença de colónias azuis/esverdeadas com halo, típicas de *L. monocytogenes*. Caso se observe a existência de colónias típicas, procede-se ao teste de confirmação por fermentação de ramnose (Rhamnose Test, Frilabo).

Tabela 6 - Microrganismos indicadores do nível de higiene pelo Regulamento (CE) número 1441/2007, *C. perfringens*, bolores e leveduras e respetivas condições de isolamento em laboratório, de acordo com as normas ISO.

| Microrganismo                            | Norma       | Meio de cultura                                  | Condições de incubação                          | Colónias típicas                                                    | Teste de confirmação                                                      |
|------------------------------------------|-------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Enterobacteriaceae                       | ISO 21528-2 | Violet Red Bile Glucose (VRBG) Agar (Biomérieux) | Incubação aeróbia a 37 °C por (24 ± 2) h        | Colónias rosa-avermelhadas ou púrpura com ou sem halo               | -Fermentação da glucose<br>-Produção de oxidase                           |
| Coliformes                               | ISO 4832    | Violet red bile lactose (VRBL) agar (Merck)      | Incubação aeróbia a 37 °C por (24 ± 2) h        | Colónias vermelho-arroxeadas com no mínimo 0,5 mm                   | <sup>1</sup>                                                              |
| <i>Escherichia coli</i>                  | ISO 16649-2 | Tryptone bile x-glucuronide (TBX) medium (VWR)   | Incubação aeróbia a (44 ± 1 °C) por 18 a 24 h   | Colónias azuis                                                      | <sup>1</sup>                                                              |
| <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> | NP 4400-1   | Baird Parker agar base (VWR)                     | Incubação aeróbia a (37 ± 1 °C) por (48 ± 4) h  | Colónias pretas ou cinzentas, brilhantes, convexas e com halo claro | -Pesquisa de coagulase;<br>-Pesquisa de catálase (facultativo)            |
| Bolores e leveduras                      | NP 3277-1   | Rose Bengal Chloramphenicol agar (VWR)           | Incubação aeróbia a (25 ± 1 °C) por (120 ± 2) h | Colónias típicas para bolores e leveduras                           | <sup>1</sup>                                                              |
| <i>Clostridium perfringens</i>           | ISO 7937    | Tryptose sulfite cycloserine agar base (Merck)   | Incubação anaeróbia a 37 °C por (20 ± 2) h      | Colónias pretas                                                     | - LS médium ou<br>-Nitrate motility medium and the lactose-gelatin medium |

1 – Não necessário

Tabela 7- Passos para o isolamento de *Salmonella* spp., meio de cultura utilizado e condições de incubação de acordo com a norma ISO 6579:2002.

| Etapa                             | Meio de cultura                                                                                                                                                                                                        | Condições de incubação           |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| <b>Pré-enriquecimento</b>         | Buffered peptone water (Oxoid)                                                                                                                                                                                         | (37 ± 1) °C durante (18 ± 2) h   |
| <b>Enriquecimento seletivo</b>    | Rappaport-Vassiliadis-Soya (RVS) broth                                                                                                                                                                                 | (41,5 ± 1) °C durante (24 ± 3) h |
|                                   | Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin (MKTn) Broth (Oxoid)                                                                                                                                                         | (37 ± 1) °C durante (24 ± 3) h   |
| <b>Isolamento e identificação</b> | Xylose lysine deoxycholate (XLD) agar                                                                                                                                                                                  | (37 ± 1) °C durante (24 ± 3) h   |
|                                   | CHROMagar Salmonella Plus (CHROMagar)                                                                                                                                                                                  | 37 °C durante 18 h a 24 h        |
| <b>Confirmação</b>                | <b>-Confirmação bioquímica</b><br>TSI agar, Urease, L-lysine decarboxylation, β-galactosidase, reação Voges-Proskauer, Indol<br><br><b>-Confirmação Serológica</b><br>Estirpes auto-aglutinantes, Antígenos (O, Vi, H) |                                  |

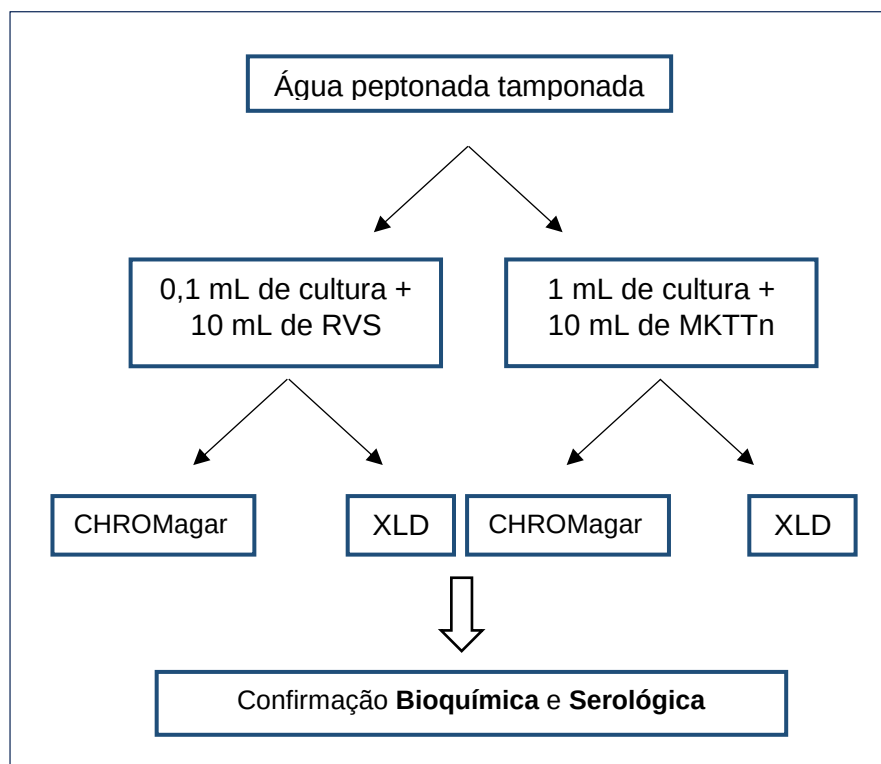


Fig. 2- Organograma para o isolamento de *Salmonella* de amostras alimentares de acordo com a norma ISO 6579:2002.

## Controlo da qualidade microbiológica de águas

### Águas para consumo humano

A enumeração de microrganismos cultiváveis foi realizada de acordo com a norma ISO 6222:1999, pelo método de espalhamento em meio Yeast Extract Agar (Oxoid), com incubação de placas a duas temperaturas: (  $36 \pm 2$  ) °C durante (  $44 \pm 4$  ) h e (  $22 \pm 2$  ) °C durante (  $68 \pm 4$  ) h.

A enumeração de microrganismos indicadores em águas de consumo foi realizada através da técnica de filtração por membrana, de acordo com as normas em vigor especificadas na Tabela 8. Basicamente procedeu-se à filtração de um volume adequado de água, geralmente 100 mL, através de uma membrana com poros de 0,45 µm, tendo-se de seguida colocado a membrana no meio de cultura adequado ao microrganismo alvo e prosseguido com a incubação de acordo com os parâmetros indicados na Tabela 8.

### Águas recreacionais

A enumeração de microrganismos cultiváveis foi realizada de acordo com a norma ISO 6222:1999, pelo método de espalhamento em meio Yeast Extract Agar (Oxoid), com incubação a (  $36 \pm 2$  ) °C durante (  $44 \pm 4$  ) h.

Nas águas recreacionais, para além da enumeração de bactérias coliformes, *E. coli* e *Enterococcus* intestinais, já descrita para as águas de consumo, é ainda levada a cabo a enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva e *P. aeruginosa*. Neste caso é também utilizada a técnica de filtração por membrana, com as normas em vigor para cada microrganismo (Tabela 8).

Tabela 8- Microrganismos indicadores para águas de consumo e águas recreacionais com obrigatoriedade de análise pelo Decreto Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto de 2007 (Ministério do Ambiente 2007) e no Decreto Regulamentar n.º 5/97 de 31 de Março (Ministério do Ambiente 1997) respetivamente.

| Microrganismo                   | Norma ISO  | Meio de cultura                                | Condições de incubação                           | Colónias típicas                                            | Teste de confirmação                  |
|---------------------------------|------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Microrganismos totais           |            |                                                |                                                  |                                                             |                                       |
| a 22 °C                         | ISO 6222   | Yeast extract agar (Oxoid)                     | Incubação aeróbia a (22 ± 2) °C por (68 ± 4) h   | Contagem do número total de colónias                        | 1                                     |
| a 37 °C                         |            |                                                | Incubação aeróbia a (36 ± 2) °C por (44 ± 4) h   |                                                             |                                       |
| Coliformes                      | ISO 9308-1 | Chromocult coliform agar (Merck)               | Incubação aeróbia a (36 ± 2) °C por (21 ± 3) h   | Colónias cor-de-rosa, vermelhas ou azuis escuras/violeta    | Teste de oxidase                      |
| <i>Escherichia coli</i>         |            |                                                |                                                  | Colónias azuis escuras/violeta                              | 1                                     |
| <i>Enterococcus</i> intestinais | ISO 7899-2 | Slanetz & Bartley (Oxoid)                      | Incubação aeróbia a (36 ± 2) °C por (44 ± 4) h   | Colónias em relevo com coloração castanha, vermelha ou rosa | Incubação em bile-aesculin-azide agar |
| <i>Clostridium perfringens</i>  | ISO 14189  | Tryptose sulfite cycloserine agar base (Merck) | Incubação anaeróbia a (36 ± 2) °C por (21 ± 3) h | Colónias pretas, cinzentas ou castanho-amareladas           | Teste fosfatase ácida                 |

|                                             |           |                                  |                                                     |                                                                         |                                       |
|---------------------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Staphylococcus</i><br>coagulase positiva | NP 4343   | Mannitol Salt Agar<br>(Oxoid)    | Incubação aeróbia a (37<br>± 1) °C por (48 ± 4) h   | Colónias com coloração<br>amarela ou branca, com ou<br>sem halo amarelo | Pesquisa de catálase<br>e coagulase   |
| <i>Pseudomonas</i><br><i>aeruginosa</i>     | ISO 16266 | Pseudomonas<br>Agar Base (Oxoid) | Incubação anaeróbia a<br>(36 ± 2) °C por (44 ± 4) h | Colónias azuis/verdes                                                   | 1                                     |
|                                             |           |                                  |                                                     | Colónias fluorescentes                                                  | -Acetamide Broth                      |
|                                             |           |                                  |                                                     | Colónias castanhas-<br>avermelhadas                                     | -Acetamide Broth<br>-Teste da oxidase |

1 – Não necessário

## Caracterização genotípica de isolados de *L. monocytogenes*

### Recolha de amostras para o estudo

As amostras de alimentos para pesquisa de *L. monocytogenes* foram recolhidas nos laboratórios BR – análises ambientais e alimentares Lda, entre Novembro de 2016 e Abril de 2017. O isolamento e identificação presuntiva de *L. monocytogenes* foi efetuado de acordo com o procedimento descrito em cima na secção “Detecção de *L. monocytogenes*”. Colónias putativas de *L. monocytogenes* foram repicadas para meio BHI (*brain heart infusion*) líquido com incubação a 28°C durante 24 a 48h, tendo-se posteriormente efetuado uma centrifugação a 7000g durante 5 min de maneira a obter um pellet de células para extração de DNA cromossomal.

### Extração e quantificação do DNA das células de *L. monocytogenes*

A extração do DNA foi efetuada usando o *EaZy Nucleic Acid (E.Z.N.A.)* Bacterial DNA purification Kit (Omega Bio-Tek, Norcross, GA), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. A qualidade do DNA cromossomal extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose a 0,75% e quantificado através do Qubit 2.0 fluorometer HS Assay (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

### Amplificação parcial da sequência do gene 16S rRNA

A mastermix para o PCR foi preparada com Tampão DreamTaq 1x, 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs), 0,2 µM dos primers, 27F e 1492 (Lane 1991), 2 U de DreamTaq DNA polymerase e 25 ng de DNA cromossomal, para um volume total de reação de 40 µL.

As condições de PCR consistiram num primeiro passo de desnaturação durante 5 minutos a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 45 segundos a 55 °C (emparelhamento) e 90 segundos a 72 °C (extensão), e concluído com um passo de extensão final de 10 minutos a 72 °C.

## Eletroforese, purificação e sequenciação dos produtos obtidos por PCR

Os produtos obtidos por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e posteriormente purificados para sequenciação. Após a eletroforese o gel foi observado num transiluminador de UV (ChemiDoc, Bio-Rad, CA), que permitiu a visualização das bandas e a sua excisão para posterior purificação. As bandas dos amplificados com tamanho de aproximadamente 1,6 kb correspondente à amplificação parcial do gene 16S RNA, foram excisadas usando o Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare), de acordo com o procedimento descrito pelo fabricante. A identidade dos produtos amplificados e purificados foi confirmada por sequenciação (Stab Vida, Oeiras) e as sequências parciais do gene 16S rRNA foram alinhadas e comparadas utilizando o Geneious® 7.1.7.

### Determinação da linhagem dos isolados por multiplex PCR

A mastermix para o PCR foi preparada com Tampão DreamTaq 1x, 0,2 mM de Desoxirribonucleotídeos Fosfatados (dNTPs), 0,5 µM de cada um dos primers (Tabela 9), 1 U de DreamTaq DNA polymerase e 25 ng de DNA alvo, para um volume total de reação de 20 µL.

Tabela 9 - Primers utilizados na reação de multiplex PCR efetuada para determinar a linhagem dos isolados de *L. monocytogenes* (Chenal-Francisque, Maury et al. 2015).

| Gene                | Primers               | Sequências                                 | Tamanho (pb) |
|---------------------|-----------------------|--------------------------------------------|--------------|
| <i>LMO2365_2638</i> | <i>LMO2365_2638-F</i> | 5'GGT CCT TCT GGA AAG CCA TT <sup>3'</sup> | 194          |
|                     | <i>LMO2365_2638-R</i> | 5'AAT TGT CCT GTC GCA TTT CC <sup>3'</sup> |              |
| <i>lmo1077</i>      | <i>lmo1077-F</i>      | 5'CGA AGC TAA AAC CGA AAA CG <sup>3'</sup> | 334          |
|                     | <i>lmo1077-R</i>      | 5'AAT TTC TGC ACG GGA ATC TG <sup>3'</sup> |              |

As condições de PCR consistiram num primeiro passo de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30

segundos a 55 °C (emparelhamento) e 75 segundos a 72 °C (extensão) e concluído com um passo de extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose a 1,5% e registados num transiluminador de UV (ChemiDoc, Bio-Rad, CA).

## Capítulo 3 - Resultados e discussão

## Controlo da qualidade microbiológica de alimentos

A análise microbiológica dos alimentos é fundamental para garantir que a indústria alimentar cumpra as diretrizes exigidas na legislação em termos de segurança alimentar e para salvaguardar os interesses dos consumidores, ao assegurar a entrada de produtos seguros no mercado. As amostras sujeitas a análise microbiológica no Laboratório Brito Rocha Lda. provieram essencialmente de produtos lácteos (leite, queijo e requeijão), alimentos e refeições ultracongeladas, fumeiro e refeições preparadas em restaurantes e cantinas. A recolha das amostras foi realizada sobretudo nos distritos da Guarda, Castelo Branco e Viseu, de acordo com a norma NP 1828:1982.

O Regulamento (CE) nº 178/2002 de 28 de Janeiro de 2002 determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios. Este prevê os fundamentos para garantir um elevado nível de proteção da saúde humana e dos interesses dos consumidores em relação aos géneros alimentícios (CE 2002). Em termos de qualidade microbiológica dos alimentos, é aplicado o Regulamento (CE) nº 1441/2007 de 5 de Dezembro, que define os critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios, facultando orientações quanto à aceitabilidade dos géneros alimentícios e dos seus processos de fabrico, manuseamento e distribuição (CE 2007)

Durante o estágio no Laboratório Brito Rocha Lda. foram essencialmente avaliados nove parâmetros no que diz respeito à qualidade microbiológica dos alimentos: microrganismos totais, Enterobacteriaceae, coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, Bolores e leveduras, *C. perfringens*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*.

### Microrganismos indicadores do nível de higiene dos processos

Pelo Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro, a pesquisa de microrganismos totais, Enterobacteriaceae, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva é indicadora do nível de higiene do processo de fabrico e permite avaliar a qualidade microbiológica do lote testado, verificar a eficácia dos princípios de análise dos perigos e de pontos de controlo críticos ou das boas práticas de higiene nos processos (CE 2007). Assim sendo, os critérios enumerados acima foram utilizados como base para a

análise microbiológica de alimentos durante o estágio, sendo aplicados em todas as amostras para análise, salvo indicação contrária por parte do cliente. Contudo, é importante referir que para a mesma amostra procedeu-se à pesquisa de Enterobacteriaceae ou de coliformes, e não de ambos os grupos em simultâneo.

A pesquisa por bolores e leveduras foi executada essencialmente nos géneros alimentícios mais suscetíveis ao desenvolvimento destes microrganismos, como produtos de panificação e pastelaria, alimentos fumados e alimentos à base de carne (Legan 1993, Mižáková, Pipová et al. 2002, Asefa, Kure et al. 2010, Axel, Zannini et al. 2017). De igual modo, a pesquisa por *C. perfringens* ocorreu sobretudo em produtos onde o seu desenvolvimento é mais frequente, como alimentos à base de carne, geralmente congelados ou embalados (Lindstrom, Heikinheimo et al. 2011, Grass, Gould et al. 2013).

### Microrganismos indicadores da segurança dos géneros alimentícios

O Regulamento (CE) n.º 1441/2007 de 5 de Dezembro define ainda os critérios para a análise microbiológica de *L. monocytogenes* e *Salmonella*, considerados microrganismos indicadores da segurança dos géneros alimentícios (CE 2007), cujas colónias típicas estão representadas nas Figuras 3 e 4, respetivamente.

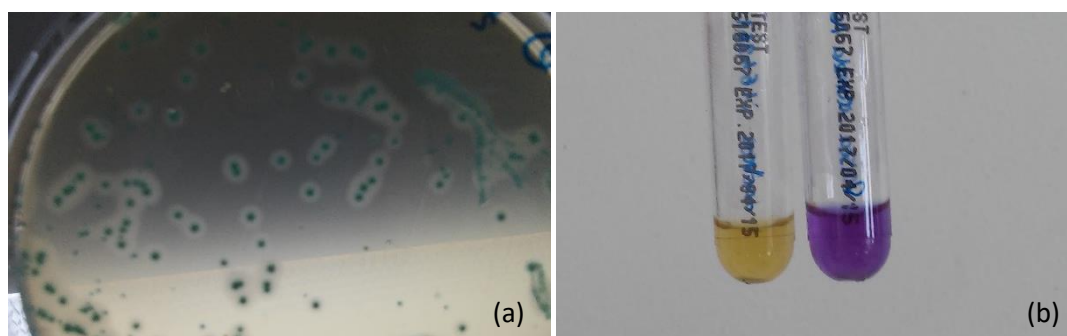


Fig. 3- (a) Riscado com crescimento de colónias típicas de *L. monocytogenes* em meio Chromogenic Listeria Agar (ALOA); (b) Resultado positivo (à esquerda) e negativo (à direita) para o teste de fermentação da ramnose (Rhamnose Test, Frilabo).



Fig. 4- Riscado com crescimento de colónias típicas de *Salmonella* sp. em meio XLD agar (colónias pretas, à esquerda) e CHROMagar Salmonella Plus (à direita)

Entre Novembro de 2016 e Abril de 2017 foram rececionadas para análise no Laboratório Brito Rocha Lda. 768 amostras de alimentos e de superfícies para pesquisa de *L. monocytogenes*, provenientes sobretudo de produtos lácteos, produtos fumados e alimentos e refeições congeladas. O método utilizado para a pesquisa de *L. monocytogenes* durante o estágio difere do método indicado na norma 11290-1 (1996) ao utilizar apenas um passo de enriquecimento seletivo, com recurso ao meio ONE Broth-Listeria (Oxoid), ao invés de dois enriquecimentos como descrito na referida norma, o primeiro com Fraser broth a 50% e o segundo com Fraser broth não diluído. Aliás, o procedimento utilizado é muito similar ao adotado no método Listeria Precis™ (ThermoScientific 2013), validado pela ISO 16140:2016 (AFNOR 2017). A utilização desta metodologia em laboratório possibilita a obtenção de resultados em apenas três dias, ao contrário dos até sete dias necessários para conseguir resultados pelo método descrito na norma 11290-1:1996 (Gómez, McGuinness et al. 2013), possibilitando ao cliente uma tomada de decisão mais rápida e eficaz no controlo da contaminação do alimento.

Apesar de em 2015 a Salmonelose ter sido considerada a segunda zoonose mais comum na União Europeia pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (Silveira 2013, EFSA 2016), e de a *Salmonella* ser frequentemente encontrada em alimentos e ambientes relacionados com a indústria alimentar, como quintas ou fábricas (Troutt, Galland et al. 2001, Padungtod and Kaneene 2006, Ferreira, Barbosa et al. 2007, Van Kessel, Karns et al. 2008, Dominguez and Schaffner 2009), esta não foi detetada em nenhuma das cerca de 480 amostras processadas para pesquisa destes microrganismos.

## Controlo da qualidade microbiológica de águas

A avaliação de parâmetros microbiológicos em águas é essencial na identificação de contaminações bacterianas, que poderão ser um indicador da presença de microrganismos patogénicos eventualmente perigosos para a saúde pública. As amostras de água recebidas no Laboratório Brito Rocha para análise dos parâmetros microbiológicos foram analisadas segundo as respetivas normas internacionais (Tabela 8).

### Águas para consumo humano

As amostras de águas para consumo humano recebidas no Laboratório Brito Rocha Lda. para análise dos parâmetros microbiológicos, provieram essencialmente de furos particulares para captação de água subterrânea e de água da rede pública de abastecimento. No último caso, a recolha das amostras foi feita essencialmente em entidades como lares de idosos, cantinas escolares ou empresas ligadas à indústria alimentar que, apesar de não estarem legalmente obrigados a fazê-lo, pretendem garantir a qualidade da água de rede que é utilizada nas suas instalações. A recolha das amostras para análise microbiológica ocorreu sobretudo nos distritos da Guarda e Castelo Branco, de acordo com a norma internacional ISO 19458:2006.

O Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, estabelece a frequência mínima de amostragem, os critérios e os métodos analíticos de referência a utilizar na avaliação da qualidade das águas destinadas ao consumo humano ou à sua utilização numa empresa da indústria alimentar em Portugal (Ministério do Ambiente 2007). Na Tabela 2 encontram-se descritos os valores paramétricos máximos permitidos para os parâmetros microbiológicos com obrigatoriedade de análise em águas de consumo: microrganismos totais a 22 °C e 37 °C, bactérias coliformes, *E. coli*, *Enterococcus* intestinais e *C. perfringens* (Ministério do Ambiente 2007). As colónias típicas para os microrganismos com obrigatoriedade de análise para águas de consumo, segundo o Decreto-Lei nº 306/2007, estão representados na Figura 5.

### Águas recreacionais

As amostras de água de recreio recolhidas para análise foram provenientes de piscinas e *jacuzzis* integrados em ginásios, essencialmente na área geográfica do concelho da Covilhã, de acordo com a norma internacional ISO 19458 (2006).

O Decreto Regulamentar n.º 5/97, de 31 de Março, define as condições a que os recintos com atividades aquáticas devem obedecer, com vista a proporcionar adequadas condições de segurança aos utentes, a limitar os riscos da ocorrência de acidentes, a facilitar a evacuação dos ocupantes e sinistrados e a proporcionar a intervenção dos meios de socorro. O atual decreto define ainda os valores paramétricos máximos permitidos para os parâmetros microbiológicos com obrigatoriedade de análise em águas recreacionais: microrganismos totais a 37 °C, bactérias coliformes, *E. coli*, *Enterococcus* fecais, *P. aeruginosa* e *Staphylococcus* coagulase positivos (Tabela 3) (Ministério do Ambiente 1997). As colónias típicas para os microrganismos com obrigatoriedade de análise para águas recreacionais estão representados na Figura 5.

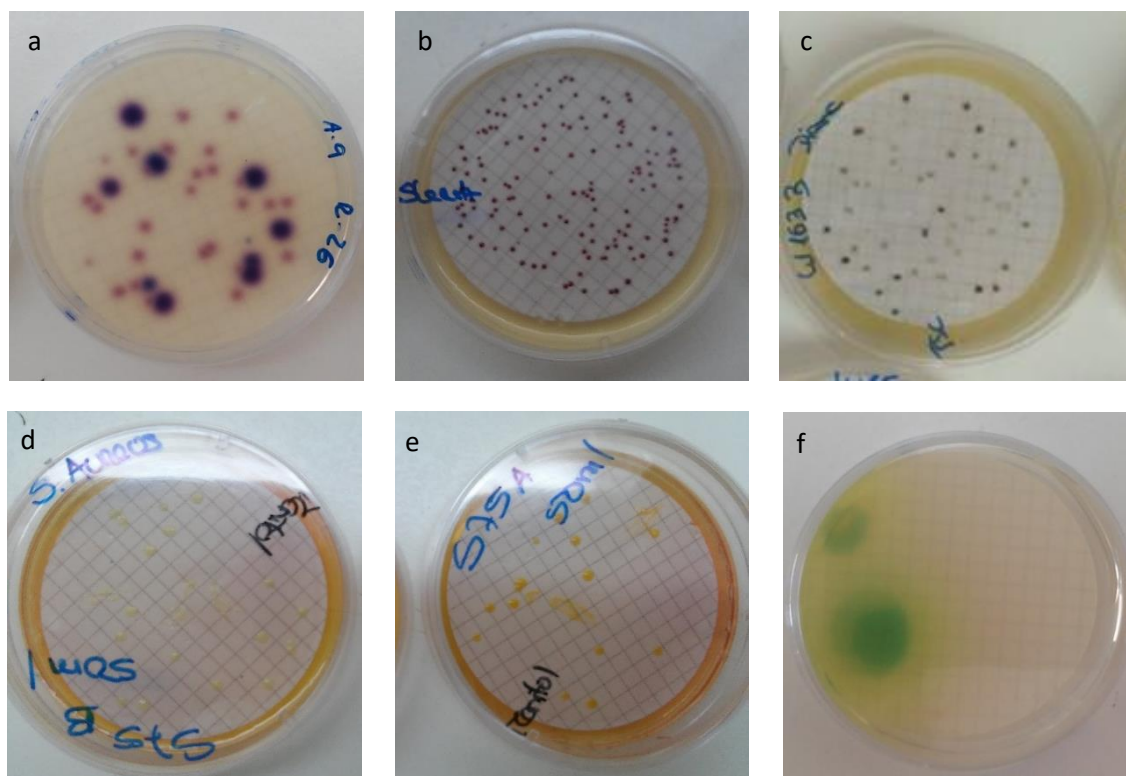


Fig. 5- Colónias típicas, obtidas pela técnica de filtração por membrana, de a) coliformes (rosa) e *E. coli* (violeta) em meio Chromocult Coliform Agar; b) *Enterococcus* em meio Slanetz and Bartley agar; c) *C. perfringens* em meio TSC agar; d) e e) *Staphylococcus* coagulase positivos em meio Mannitol agar e f) *P. aeruginosa* em meio Pseudomonas agar base.

## Caracterização de isolados de *L. monocytogenes*

### Isolamento e identificação de *L. monocytogenes*

Das 768 amostras de alimentos e de superfícies rececionadas para pesquisa de *L. monocytogenes* no Laboratório Brito Rocha durante o estágio, 52 deram positivo para a presença de *L. monocytogenes*, pelos métodos descritos na secção 2. No seu conjunto foram obtidos 56 isolados de presumíveis *L. monocytogenes* com origem em nove empresas diferentes (#1 a #9), das quais seis pertencem ao ramo dos lacticínios (#1, #4, #5, #6, #8 e #9), sendo a principal atividade a produção de queijo, duas empresas dedicam-se à produção de fumeiro (#3 e #7) e uma empresa (#2) atua na produção e comercialização de alimentos congelados (Tabela 10).

Tabela 10 - Empresas que fizeram parte do estudo, respetiva localização e área de negócio.

| Empresa | Localização       | Área de negócio                  |
|---------|-------------------|----------------------------------|
| #1      | Trancoso          | Produção de Queijo               |
| #2      | Moimenta da Beira | Produção de produtos alimentares |
| #3      | Seia              | Produção de Fumeiro              |
| #4      | Castelo Branco    | Produção de Queijo               |
| #5      | Fundão            | Produção de Queijo               |
| #6      | Seia              | Produção de Queijo               |
| #7      | Trancoso          | Produção de Fumeiro              |
| #8      | Castelo Branco    | Produção de Queijo               |
| #9      | Castelo Branco    | Produção de Queijo               |

Das 52 amostras a partir das quais foram obtidos isolados presuntivos de *L. monocytogenes*, 38 amostras (73%) correspondem a queijos e 5 (10%) a leites destinados à produção de queijo; 5 amostras (10%) dizem respeito a superfícies relacionadas com a produção de queijo, tais como as redes ou moldes de fabrico ou as mesas de lavagem; e as restantes 4 amostras (7%) correspondem a alimentos produzidos à base de carne, nomeadamente espetadas de carne com pimentos, mistura

de carne picada, chouriça de porco bísaro e bifes de frango panados ultracongelados (Tabela 11). Ou seja, no total das 52 amostras positivas para *L. monocytogenes* recolhidas durante os 6 meses, 48 (92%) correspondem a alimentos ou superfícies provenientes da indústria da produção de queijos, e apenas 4 (8%) tiveram origem em outro tipo de indústria, neste caso de alimentos produzidos à base de carne.

Tabela 11 - Caracterização dos 56 isolados de *L. monocytogenes* recolhidos entre Novembro de 2016 e Abril de 2017 no laboratório Brito Rocha Lda.

| Empresa | Isolados (Lm)     | Isolamento | Origem                          |
|---------|-------------------|------------|---------------------------------|
| #1      | 1a/b <sup>1</sup> | 15/11/2016 | Queijo de Ovelha                |
|         | 4a/b <sup>1</sup> | 29/11/2016 | Queijo de Ovelha                |
|         | 5                 | 29/11/2016 | Mesa de Lavagem de Queijo       |
|         | 39                | 08/03/2017 | Leite de Ovelha                 |
| #2      | 2                 | 27/11/2016 | Espetada de Carne de Porco      |
|         | 40                | 08/03/2017 | Bife de Frango Panado Congelado |
| #3      | 3                 | 27/11/2016 | Mistura de Carnes Picadas       |
| #4      | 6                 | 03/01/2017 | Queijo de Ovelha                |
|         | 8                 | 11/02/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca  |
|         | 9                 | 11/02/2017 | Leite de Ovelha                 |
|         | 10                | 11/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 11                | 11/02/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca  |
|         | 13                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Vaca         |
|         | 14                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 15                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 16                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 17                | 20/02/2017 | Redes de fabrico de Queijo      |
|         | 18                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 19                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha                |
|         | 20                | 20/02/2017 | Queijo de Cabra                 |
|         | 21                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha                |
|         | 22                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra        |
|         | 23                | 20/02/2017 | Leite de Ovelha                 |
|         | 24                | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Vaca         |

|           |                     |            |                                             |
|-----------|---------------------|------------|---------------------------------------------|
|           | 25                  | 20/02/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 26                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha                            |
|           | 27                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 28                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 29                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 30 a/b <sup>1</sup> | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha, Vaca e Cabra              |
|           | 31                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 32                  | 06/03/2017 | Redes de fabrico de Queijo após Desinfecção |
|           | 33                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha                            |
|           | 34                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha, Vaca e Cabra              |
|           | 35                  | 06/03/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 36                  | 06/03/2017 | Molde de Fabrico de Queijo                  |
|           | 41                  | 05/04/2017 | Leite de Ovelha                             |
|           | 42                  | 05/04/2017 | Leite de Ovelha, Cabra e Vaca               |
| <b>#5</b> | 7                   | 13/01/2017 | Queijo de Ovelha, Vaca e Cabra              |
| <b>#6</b> | 12                  | 11/02/2017 | Queijo de Ovelha, Vaca e Cabra              |
| <b>#7</b> | 37                  | 08/03/2017 | Chouriça de Porco Bísaro                    |
| <b>#8</b> | 38                  | 08/03/2017 | Queijo de Ovelha                            |
|           | 44a/b <sup>1</sup>  | 15/04/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 45                  | 15/04/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 46                  | 15/04/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 47                  | 12/04/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca              |
|           | 49                  | 17/04/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca              |
|           | 50                  | 17/04/2017 | Água de Lavagem dos Queijos                 |
|           | 51                  | 17/04/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca              |
|           | 52                  | 15/04/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
| <b>#9</b> | 43                  | 05/04/2017 | Queijo de Ovelha e Cabra                    |
|           | 48                  | 12/04/2017 | Queijo de Ovelha, Cabra e Vaca              |

---

<sup>1</sup>Uma amostra deu origem a dois isolados, designados por a e b.

A *L. monocytogenes* está frequentemente presente em silagem de má qualidade e em animais ruminantes, que podem ser transmissores do patógeno quer como portadores assintomáticos quer através de mastites (Linton, Mackle et al. 2008, Osman, Zolnikov et al. 2014, Melo, Andrew et al. 2015), sendo por isso um contaminante constante em ambientes de produção de leite e queijo (Rudolf and Scherer 2001, Mena,

Almeida et al. 2004, Pintado, Oliveira et al. 2005, Arslan and Özdemir 2008, Iannetti, Acciari et al. 2016). Apesar de grande parte da indústria de queijo utilizar leite pasteurizado como matéria prima, continua a fazer parte da dieta Portuguesa queijo produzido através de leite não tratado de ovelha e cabra (Almeida, Magalhaes et al. 2013). De entre os queijos Portugueses com Denominação de Origem Protegida (DOP), o Queijo Serra da Estrela DOP está incluído no grupo de queijos que são confeccionados com leite cru, juntamente com o Queijo de Castelo Branco DOP (AESBUC/UCP 2003). O Laboratório Brito Rocha Lda, localizado na Covilhã, está muito próximo de duas zonas geográficas de produção de queijo DOP não pasteurizado. É portanto compreensível que 92% das amostras positivas para *L. monocytogenes* correspondam a alimentos ou superfícies ligadas à indústria de produção de queijo, quer devido à elevada quantidade de amostras analisadas provenientes desta indústria, quer devido ao fato de a *L. monocytogenes* ser um contaminante constante em ambientes de produção de leite e queijo. Importa referir que o leite cru pode ser contaminado com *L. monocytogenes* através do equipamento de ordenha, durante o armazenamento em tanques ou durante o transporte para as instalações de produção de queijo onde as medidas de higiene não sejam adequadas (Almeida, Magalhaes et al. 2013, Melo, Andrew et al. 2015). Sabe-se que a sobrevivência e crescimento de *L. monocytogenes* em queijos depende em grande parte das condições de manufatura, maturação e armazenamento (Schoder, Rossmanith et al. 2012, Dikici and Calicioglu 2013, Wemmenhove, Stampelou et al. 2013, Melo, Andrew et al. 2015)

A deteção presuntiva de *L. monocytogenes* nas amostras de alimentos e superfícies baseia-se em meios de cultura de enriquecimento, seletivos e diferenciais. Esta metodologia, não permitindo um crescimento absolutamente seletivo para *L. monocytogenes* em relação a outras espécies de *Listeria*, permite a diferenciação de isolados de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* em relação a outras espécies de *Listeria* (Oxoid 2004). De fato, após o passo de enriquecimento seletivo em meio ONE Broth-*Listeria* (Oxoid) e incubação em meio ALOA (Ottaviani 1997), podem obter-se essencialmente dois tipos de colónias: azuis/verdes com halo ou azuis/verdes sem halo (Figura 6), sendo que as primeiras correspondem a *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii* e as segundas a *Listeria* spp., entre as quais *L. innocua* (Oxoid 2017). No final deste processo é necessário realizar um teste de fermentação de ramnose em colónias azuis com halo, para identificação de colónias típicas de *L. monocytogenes* ramnose positivas, e as distinguir de *L. ivanovii*, que são ramnose negativas (Tabela 12).

Tabela 12- Características de colónias dos microrganismos representados em meio ALOA e respetiva capacidade de fermentação de ramnose.

| Microrganismo                    | Colónias em meio Aloa         | Fermentação ramnose |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>    | Azuis com halo                | +                   |
| <i>Listeria ivanovii</i>         | Azuis com halo                | -                   |
| <i>L. innocua</i>                | Azuis sem halo                | +/-                 |
| <i>Cellulosimicrobium funkei</i> | Verdes com halo esbranquiçado | -                   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>     | Azul-esverdeadas sem halo     | +/-                 |

+ : fermenta ramnose; - : não fermenta ramnose; +/- : pode fermentar ramnose

O meio de enriquecimento seletivo ONE Broth-*Listeria* (Oxoid) promove a recuperação e crescimento de *Listeria* spp., pelo que pode ocorrer o crescimento de outras espécies de *Listeria*, como *L. ivanovii* e *L. innocua*, juntamente com *L. monocytogenes*. Após incubação em meio ALOA, é necessário avaliar minuciosamente a morfologia das colónias, de maneira a garantir que são apenas retiradas para confirmação as colónias típicas para *L. monocytogenes*, azuis/verdes com halo. Caso a morfologia seja mal avaliada e seja escolhida para confirmação uma colónia não típica para *L. monocytogenes*, pertencente a uma estirpe ramnose positiva, como *L. innocua* (Petran and Swanson 1993, McLauchlin 1997), poderá verificar-se a ocorrência de falsos positivos.

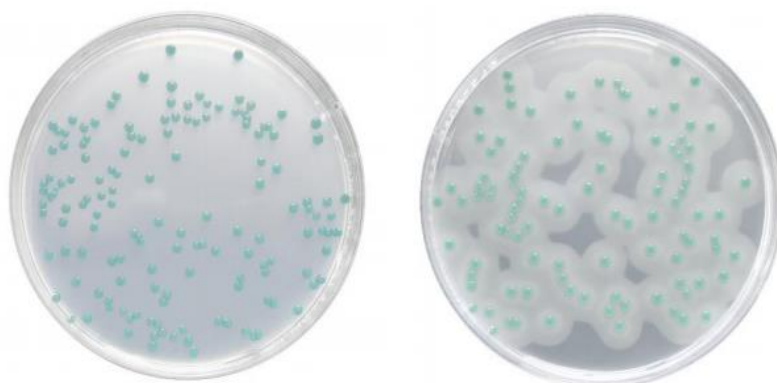


Fig. 6- Morfologia típica de colónias de *L. innocua*, à esquerda e de *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, à direita, em meio ALOA (Sigma)

Em amostras onde a flora bacteriana secundária é muito elevada (Figura 7), pode ocorrer a co-extração de uma colónia típica para *L. monocytogenes* e de uma outra colónia atípica para realização do teste de confirmação. Neste caso, se a colónia típica pertence efetivamente a *L. monocytogenes*, não há interferência da colónia atípica no resultado. No entanto, caso a colónia típica pertença a *L. ivanovii* e a atípica a uma bactéria ramnose positiva, pode verificar-se novamente um resultado falso positivo. Para prevenir situações como a descrita, seria recomendável a adição de um passo de isolamento de uma única colónia típica de *L. monocytogenes*, novamente em meio ALOA, de modo a obter uma cultura pura para confirmação por fermentação de ramnose.

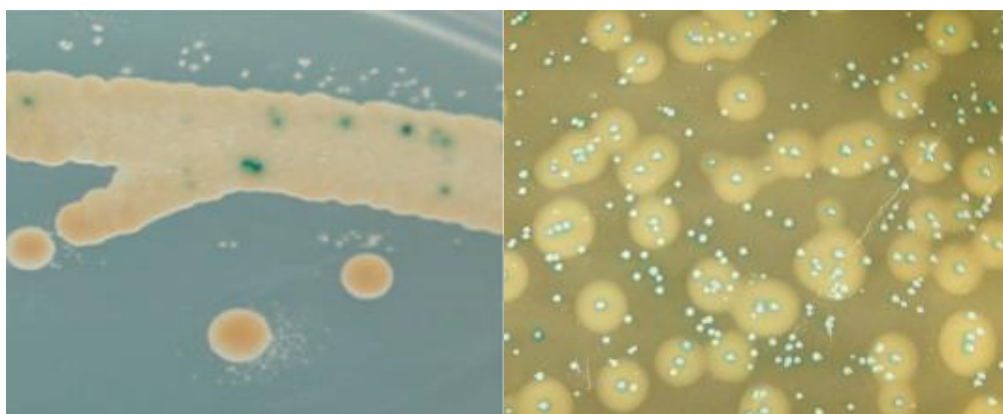


Fig. 7- Colónias de *L. monocytogenes* em meio ALOA quando a flora bacteriana secundária é muito elevada (Stessl, Luf et al. 2009, Biolife 2010)

Apesar do meio ALOA ser seletivo e diferencial para *Listeria*, existem outros microrganismos, como *Bacillus* spp., *Cellulosimicrobium* spp., *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. capazes de crescer na forma de colónias fenotipicamente muito similares às formadas por *Listeria*. A identificação das colónias de *Listeria* em meio ALOA é baseada na atividade da  $\beta$ -glucosidase, presente quer em espécies de *Listeria* quer nos microrganismos enumerados acima, que cliva o cromogénio e dá origem à coloração verde/azul das colónias (Angelidis, Kalamaki et al. 2015). Apesar de os *Enterococcus* spp. possuírem atividade  $\beta$ -glucosidase, no meio ALOA estão incorporados agentes seletivos (cloreto de lítio, polimixina B e ácido nalidíxico) com o objetivo de inibir o seu crescimento (Greenwood, Willis et al. 2005, Oxoid 2017). Não obstante, estudos mostram que esta bactéria cresce em meio ALOA na forma de colónias azul-esverdeadas sem halo (Fig. 8) (Vlaemynck, Lafarge et al. 2000, Willis, Baalham et al. 2006, Stessl, Luf et al. 2009, Angelidis, Kalamaki et al. 2015). À exceção

da ausência de halo, as colónias formadas pela espécie *E. faecalis* são morfologicamente muito similares às formadas por *L. monocytogenes* no mesmo meio (Figura 6) e, para além disso, podem fermentar ramnose (Manero and Blanch 1999, Ziadi, Mhir et al. 2016). Assim, caso as colónias de *E. faecalis* sejam erradamente identificadas como típicas de *L. monocytogenes* e confirmadas por um teste de fermentação de ramnose positivo, ocorrerá uma confirmação errada da presença de *L. monocytogenes* no alimento ou superfície analisada.

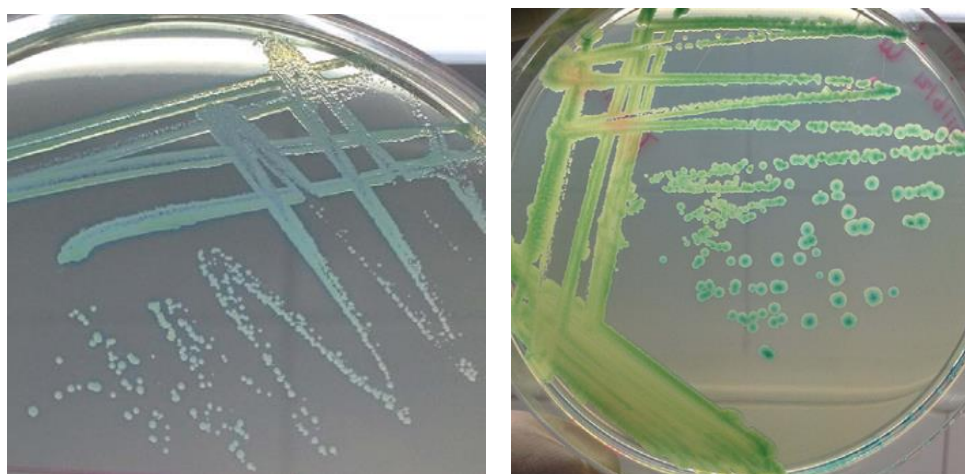


Fig. 8- Colónias típicas para *Enterococcus* sp. (esquerda) e *Cellulosimicrobium funkei* (direita) em meio ALOA (Angelidis, Kalamaki et al. 2015)

*Cellulosimicrobium* spp. é uma espécie de bactéria muito raramente isolada a partir de alimentos (Angelidis, Kalamaki et al. 2015) e, possivelmente por essa razão, não existem agentes seletivos no meio ALOA com o propósito de inibir o seu crescimento. Deste modo, a espécie *Cellulosimicrobium funkei* consegue desenvolver-se em meio ALOA, onde forma colónias verdes com halo esbranquiçado (Figura 8), similares às colónias típicas para *L. monocytogenes* nesse meio (Angelidis, Kalamaki et al. 2015). Contudo *C. funkei* não fermenta ramnose (Brown, Steigerwalt et al. 2006) e portanto não deveria dar origem a falsos positivos no teste de confirmação utilizado.

Um falso positivo pode ter consequências significativas a nível económico para a empresa, pois poderá levar à rejeição de todo o lote ao qual o alimento identificado como contaminado pertence. Pode ainda ocorrer a paragem das linhas de produção para se proceder à desinfeção de superfícies e equipamentos, levando à diminuição ou paragem da produção de determinados produtos nesse intervalo de tempo. Neste contexto abordagens moleculares podem ser fundamentais para determinar inequivocamente a identidade dos isolados. Tendo em conta que os grupos bacterianos

descritos que podem dar origem a falsos positivos pertencem a outros géneros, a sequenciação parcial do gene 16S rRNA pode facilmente resolver este conflito na identificação. Aliás esta foi a abordagem seguida por Angelidis et al. (2015) para identificarem outros grupos bacterianos que podem ser isolados com o ALOA, nomeadamente os já referidos *C. funkei* e *Enterococcus faecalis*, e outras espécies ubíquas que podem ocorrer nos alimentos como espécies de *Bacillus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Para além da possibilidade de acontecerem falsos positivos, há ainda estudos que descrevem a ocorrência de falsos negativos para a presença de *L. monocytogenes* em meio ALOA (Vlaemynck, Lafarge et al. 2000, Leclercq 2004, Becker, Schuler et al. 2006, Stessl, Luf et al. 2009). Poderá assim ocorrer a entrada de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* para a cadeia de distribuição, com possíveis consequências nefastas para os consumidores.

#### Sequenciação parcial do gene 16S rRNA de presumíveis *L. monocytogenes*

A sequenciação parcial do gene 16S rRNA é frequentemente utilizada para identificar e diferenciar microrganismos, permitindo a caracterização taxonómica e filogenética de bactérias (Langille, Zaneveld et al. 2013). Embora os polimorfismos do gene 16S rRNA sejam na generalidade informativos para caracterizar isolados a nível do género, a verdade é que frequentemente não permitem a identificação segura a nível da espécie. De fato, discriminar entre *L. monocytogenes* e *L. innocua* pela análise das sequências do gene 16S rRNA, não é seguro devido à elevada similaridade (99,2%) de sequências deste gene para estas duas espécies (Soni and Dubey 2014).

Nos resultados da análise da sequência parcial do gene 16S rRNA (Anexo I e II), ilustrados na Tabela 13, dos 56 isolados obtidos como presuntivos *L. monocytogenes*, 9 isolados (Lm3, Lm5, Lm13, Lm17, Lm31, Lm44a, Lm45, Lm46 e Lm47) foram inconclusivos acerca da espécie de *Listeria* à qual pertencem, nomeadamente *L. monocytogenes* ou *Listeria innocua*, com similaridades de 98% a 100%. Para além dos resultados inconclusivos para estes 9 isolados, a comparação das sequências parciais do gene 16S rRNA mostrou ainda que 6 dos isolados não fazem parte do género *Listeria*: dois isolados foram identificados como *Cellulosimicrobium* sp. (Lm 1a, e Lm 40), um isolado como *Lysinibacillus fusiformis* (Lm4b) e os restantes três isolados foram

identificados como *Enterococcus faecalis* (Lm30a/b, Lm44b e Lm52). Curiosamente estes resultados confirmam os trabalhos de Angelidis et al. (2016) relativos ao carácter não seletivo do meio ALOA para *Cellulosimicrobium* sp. e *Enterococcus faecalis*, sendo que mesmo o teste da ramnose não permitiu excluir o isolado de *Cellulosimicrobium* sp. como seria de esperar. Relativamente a estes dois grupos é importante salientar que a sua presença nas amostras de alimentos analisada não pode ser considerada uma situação de exceção, pelo que a existência de falsos positivos relativos a estes grupos pode ser mais comum do que seria expectável. De fato, *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva que faz parte da flora intestinal normal de humanos e mamíferos (Kuriyan, Sridhar et al. 2014), podendo mesmo estar presente em secreções (orofaríngeal e vaginal) e na pele (Ceci, Delpech et al. 2015). Não é portanto surpreendente que estas bactérias, consideradas como um indicador de contaminação fecal (Byappanahalli, Nevers et al. 2012), sejam facilmente isoladas de uma variedade de ambientes, como solo, areia, vegetação e águas. Adicionalmente, como bactérias comensais do trato gastrointestinal, incluindo de animais lactantes, são contaminantes frequentes de leite cru ou queijos produzidos com leite não tratado (Angelidis, Kalamaki et al. 2015), pelo que compartilha os mesmos nichos de *L. monocytogenes*. A reforçar estes dados, é importante referir que os quatro isolados identificados como *E. faecalis* (Lm30a/b, Lm44b, Lm52) pela análise da sequência parcial do gene 16S rRNA, foram obtidos a partir de queijos, tornando provável que a contaminação dos queijos com este microrganismo tenha ocorrido através da utilização de leite contaminado que não terá sido devidamente tratado.

Quanto a *Cellulosimicrobium* sp., são bacilos Gram-positivos, não-esporulantes (Brown, Steigerwalt et al. 2006), simbióticos e xilanolíticos, geralmente isolados de ambientes como o solo, o organismo humano ou de animais, mas muito raramente encontradas em matrizes alimentares. Este género compreende três espécies: *C. cellulans*, *C. funkei* e *C. terreum*, sendo esta última mais distante geneticamente das restantes, pelo que é possível discrimina-la através da sequência do gene 16S rRNA (Bakalidou, Kampfer et al. 2002). Estes microrganismos têm uma temperatura ótima de crescimento entre os 20 °C e os 25 °C, mas conseguem desenvolver-se entre os 0 °C e os 30 °C (Antony, Krishnan et al. 2009), pelo que a refrigeração de matérias-primas ou produtos lácteos não condiciona a sua ocorrência nestas matrizes alimentares. O isolado Lm1b, recolhido juntamente com uma colónia de *L. monocytogenes* (Lm1a), foi obtido de uma amostra de bife de frango panado ultracongelado, e corresponde de fato a um isolado de *Cellulosimicrobium* sp., o que está de acordo com um estudo prévio

que mostra que esta bactéria consegue sobreviver a temperaturas de congelamento (Antony, Krishnan et al. 2009).

Tabela 13 - Resultados obtidos por sequenciação do gene 16S rRNA e multiplex PCR para os 56 isolados de *L. monocytogenes*.

| Empresa | Isolados (Lm)   | Sequenciação e multiplex PCR       | Complexos clonais             |
|---------|-----------------|------------------------------------|-------------------------------|
| #1      | 1a <sup>1</sup> | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5 |
|         | 1b <sup>1</sup> | <i>Cellulosimicrobium sp</i>       |                               |
|         | 4a <sup>1</sup> | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 4b <sup>1</sup> | <i>Lysinibacillus fusiformis</i>   | -                             |
|         | 5               | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                             |
|         | 39              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
| #2      | 2               | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 40              | <i>Cellulosimicrobium sp</i>       | -                             |
| #3      | 3               | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
| #4      | 6               | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 8               | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 9               | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5 |
|         | 10              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 11              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 13              | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                             |
|         | 14              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 15              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 16              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 17              | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                             |
|         | 18              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 19              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 20              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 21              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 22              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 23              | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5 |
|         | 24              | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5 |
|         | 25              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 26              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 27              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 28              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |
|         | 29              | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9  |

|           |                     |                                    |                                                               |
|-----------|---------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
|           | 30 a/b <sup>1</sup> | <i>Enterococcus faecalis</i>       | -                                                             |
|           | 31                  | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                                                             |
|           | 32                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
|           | 33                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
|           | 34                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 35                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 36                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
|           | 41                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 42                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
| <b>#5</b> | 7                   | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
| <b>#6</b> | 12                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
| <b>#7</b> | 37                  | Linhagem I ou II                   | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5<br>CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9 |
| <b>#8</b> | 38                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 44a <sup>1</sup>    | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                                                             |
|           | 44b <sup>1</sup>    | <i>Enterococcus faecalis</i>       | -                                                             |
|           | 45                  | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                                                             |
|           | 46                  | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                                                             |
|           | 47                  | <i>L. monocytogenes/L. innocua</i> | -                                                             |
|           | 49                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
|           | 50                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 51                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |
|           | 52                  | <i>Enterococcus faecalis</i>       | -                                                             |
| <b>#9</b> | 43                  | Linhagem II                        | CC7, CC8, CC121, CC155 e CC9                                  |
|           | 48                  | Linhagem I                         | CC1, CC2, CC4, CC6, CC3 e CC5                                 |

<sup>1</sup>Uma amostra deu origem a dois isolados, designados por a e b.

Para além da possível ocorrência de falsos positivos a partir do método descrito para pesquisa de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos, convém ainda resolver erros na identificação da espécie de *Listeria*. Importa assim implementar metodologias complementares de identificação que permitam a distinção clara entre *L. monocytogenes* e as restantes espécies de *Listeria* spp. Atualmente, as abordagens moleculares ocupam uma posição privilegiada para conseguir num curto espaço de tempo e a custos reduzidos, a identificação inequívoca da maior parte de microrganismos associados a toxi-infecções alimentares. Alguns destes métodos moleculares permitem inclusivamente a caracterização de genótipos, o que se torna particularmente valioso para inferências epidemiológicas. Um exemplo do potencial de

genotipagem destas técnicas é o método descrito por Cocolin et al (2002), onde é possível diferenciar *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* e *L. ivanovii* através da amplificação por PCR de um fragmento do gene *iap* e a posterior análise dos produtos de PCR através de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) (Cocolin, Rantsiou et al. 2002). O gene *iap*, que codifica a proteína p60, possui regiões comuns e variáveis dentro do género *Listeria*. Segundo Burbet et al. (1992) as regiões terminais 5' e 3' do gene *iap* são altamente conservadas entre a espécie, permitindo selecionar primers específicos. Por outro lado, a sequência da parte central deste gene, que surge conservada dentro de cada espécie de *Listeria*, mostrou ser altamente variável entre diferentes espécies de *Listeria*. Estas características levam a que o gene *iap* seja um alvo por excelência para a diferenciação de *Listeria* spp. por análise de polimorfismos no gene (Bubert, Kohler et al. 1992). O potencial de genotipagem do gene *iap* permite assim fazer um rastreamento rápido de isolados de *Listeria* eventualmente pertencentes a diferentes espécies.

#### Determinação da linhagem dos isolados de *L. monocytogenes* por multiplex PCR

Chenal-Francisque et al. (2015) propuseram um método de multiplex PCR para identificar de forma rápida 11 dos clones mais comuns de *L. monocytogenes* e respetivas linhagens (Tabela 4). Com o objetivo de contribuir para esclarecer a identidade clonal dos isolados de *Listeria* sp. obtidos e avaliar a persistência de determinados genótipos nas matérias primas e instalações das empresas em estudo, foi realizado um duplex PCR em todos os isolados para deteção dos loci Imo1077 e LMO2365\_2638, de acordo com o descrito.

Em 4 das 9 empresas estudadas (#3, #5, #6 e #7) e considerando o total de diferentes amostras analisadas, foram isolados clones de *L. monocytogenes* apenas a partir de uma amostra proveniente de cada uma destas empresas (Tabela 11). Na empresa #2 foram inicialmente recolhidas duas amostras de alimentos a partir das quais foi possível obter dois isolados identificados como *L. monocytogenes*. Contudo, por análise da sequência parcial do gene 16S rRNA verificou-se que um dos isolados (Lm40) correspondia a *Cellulosimicrobium* sp (Tabela 13).

Desta forma, em 55% empresas abrangidas pelo estudo e considerando as várias amostragens feitas, apenas uma das amostras de cada empresa mostrou ser

positiva para a presença de *L. monocytogenes*. O fato de nas análises posteriores feitas a amostras destas empresas não ter sido detetada *L. monocytogenes*, sugere que a sua presença foi episódica e que estas empresas terão implementado medidas de desinfecção eficazes nas instalações após a contaminação, e/ou adotado um controlo mais apertado das matérias primas, prevenindo o reaparecimento de *L. monocytogenes* nas amostras analisados posteriormente.

Na empresa #1, com exceção do isolado Lm5, todos os presumíveis isolados de *L. monocytogenes* foram confirmados através da análise da sequência parcial do gene de 16S rRNA. Adicionalmente, em duas amostras, para além de isolados de *L. monocytogenes* (Lm1 e Lm4), foram ainda co-isoladas colónias de *Cellulosimicrobium spp.* (Lm1b) e *Lysinibacillus fusiformis* (Lm4b), respetivamente. Estas bactérias surgiram, portanto, associadas a culturas de isolados de *L. monocytogenes*, que não estariam puras. À exceção do isolado Lm39, que foi obtido em Março de 2017, os restantes isolados (Lm1a e Lm4a) foram recolhidos durante o mês de Novembro de 2016. Dos três isolados de *L. monocytogenes* obtidos a partir de amostras provenientes da empresa #1 foi possível determinar que o isolado Lm1a pertencia à linhagem I e os isolados Lm4a e Lm39 à linhagem II (Tabela 13). Estes dados de caracterização genotípica sugerem a existência de diferentes focos de contaminação na empresa. Para além disso, o surgimento de dois isolados pertencentes à linhagem II, recolhidos com um intervalo temporal de quatro meses, sugere uma desinfecção deficiente das instalações, permitindo a manutenção e crescimento da bactéria ou recontaminação com uma estirpe de *L. monocytogenes* da mesma linhagem, através da introdução de novas matérias-primas no processo de produção.

A empresa #4 foi aquela onde foram identificadas mais amostras alimentares positivas para *L. monocytogenes*, tendo sido obtido um total de 31 presumíveis isolados de *L. monocytogenes*, ou seja 56% do número total de isolados obtidos no período de análise e para o conjunto das nove empresas. Destes 31 isolados, a análise da sequência parcial do gene 16S rRNA revelou que dois dos isolados obtidos a partir de queijo de ovelha, vaca e cabra pertenciam a *Enterococcus faecalis* (Lm30a/b), e não foi conclusiva acerca da espécie de *Listeria* de três isolados (Lm13, Lm17 e Lm31), não sendo possível discriminar entre *L. monocytogenes* ou *L. innocua*. No entanto, a partir das análises de genotipagem por duplex PCR dos loci lmo1077 e LMOF2365\_2638 (Figura 9), a ausência de amplificação sugere que se tratam de isolados de *L. innocua*, ou de clones de *L. monocytogenes* negativos para a presença destes loci. Neste sentido

importa lembrar que esta técnica de genotipagem, proposta por Chenal-Francisque et al. (2015), apenas permite identificar os 11 clones mais comuns de *L. monocytogenes*.

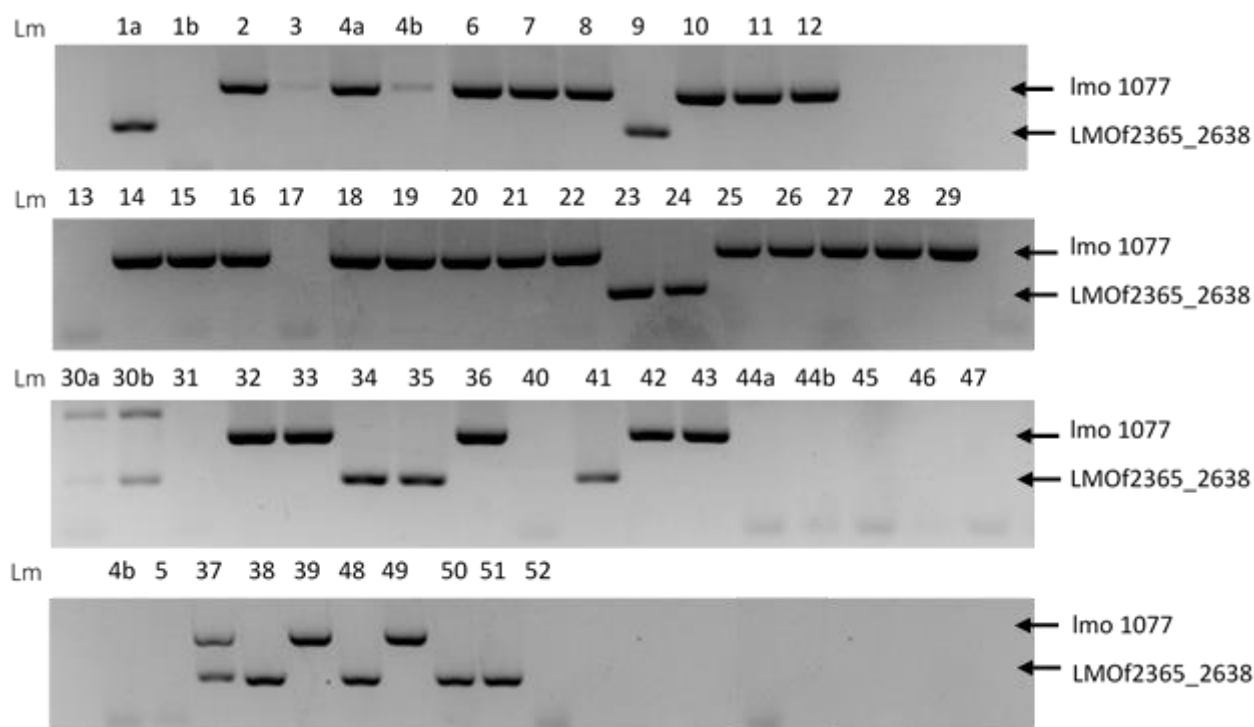


Fig. 9- Duplex PCR dos genes Imo 1077 e LMOF2365\_2638 dos isolados de *L. monocytogenes*, com 334 pb e 194 pb, respetivamente (Chenal-Francisque, Maury et al. 2015).

Ainda para a mesma empresa (#4), dos restantes isolados obtidos, seis pertencem à linhagem I (Lm9, Lm23, Lm24, Lm34, Lm35 e Lm41) e vinte pertencem à linhagem II (Lm6, Lm8, Lm10, Lm11, Lm14, Lm15, Lm16, Lm18, Lm19, Lm20, Lm21, Lm22, Lm25, Lm26, Lm27, Lm28, Lm29, Lm32, Lm33, Lm36, Lm42). Dois dos isolados pertencentes à linhagem II, Lm32 e Lm36, foram obtidos a partir de redes de fabrico de queijo após desinfeção e molde de fabrico de queijo, respetivamente. Neste contexto, pode estabelecer-se uma relação entre as superfícies contaminadas com *L. monocytogenes* e os isolados que pertencem à linhagem II, sugerindo que a contaminação terá ocorrido através do contato com as redes e os moldes de fabrico. Nas cinco datas distintas em que se processaram amostras positivas para *L. monocytogenes* para esta empresa (Tabela 11), verificou-se o isolamento tanto de estirpes da linhagem I como II, com exceção da data 03/01/2017, onde apenas foi obtido um isolado (Lm6). Este perfil parece sugerir que as instalações da empresa foram alvo de diferentes contaminações, provenientes de várias fontes, que podem ter ocorrido devido à falta de boas práticas de higiene e/ou a um controlo deficiente das matérias primas usadas nos processos. As evidências de que as contaminações persistiram

durante, no mínimo, um mês nos alimentos produzidos, mostra que a empresa após ter sido notificada terá permitido a ocorrência de novas contaminações pós-desinfecção, possivelmente através da entrada de matérias primas contaminadas, e/ou foi incapaz de eliminar eficazmente o foco ou focos de contaminação, através da limpeza e desinfecção dos equipamentos e das instalações. Aliás, a deteção de um isolado de *L. monocytogenes* (Lm32) em redes de fabrico de queijo após desinfecção, é um indicador claro da ineficácia dos desinfetantes utilizados pela empresa #4 na eliminação de biofilmes da bactéria nos equipamentos e instalações da empresa.

Na empresa #8 foram identificadas 9 amostras alimentares contaminadas com *L. monocytogenes*, sendo que em quatro destas amostras, que resultaram nos isolados Lm44a, Lm45, Lm46 e Lm47, não foi possível confirmar se os isolados pertenciam a *L. monocytogenes* ou *L. innocua*. No entanto, de modo similar ao descrito para as amostras Lm13, Lm17 e Lm31, a ausência de amplificação dos loci lmo1077 e LMOF2365\_2638 nas análises de genotipagem por duplex PCR (Figura 9) para os isolados Lm44a, Lm45, Lm46 e Lm47 sugere que se tratam de isolados de *L. innocua*, ou de clones de *L. monocytogenes* negativos para a presença destes loci. Para os restantes isolados da empresa #8, os estudos de genotipagem por duplex PCR permitiram identificar os isolados Lm38, Lm50 e Lm51 como pertencentes à linhagem I e o isolado Lm49 como pertencente à linhagem II, evidenciando a existência de múltiplas fontes de contaminação de *L. monocytogenes* nos produtos alimentares da empresa #8, uma vez que os isolados pertencem a duas linhagens distintas. Os isolados Lm49, Lm50 e Lm51, foram obtidos em datas de amostragem separadas aproximadamente por um mês em relação ao isolado Lm38 (17/04/2017 e 8/03/2017, respetivamente) (Tabela 11), sugerindo a persistência da contaminação por uma estirpe de *L. monocytogenes* pertencente à linhagem I durante pelo menos um mês ou a contaminação por outras estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes à linhagem I.

Os isolados Lm43 e Lm48, isolados a partir de alimentos produzidos na empresa #9, foram identificados como *L. monocytogenes* pertencentes à linhagem II e linhagem I, respetivamente. Os isolados foram obtidos em duas datas distintas, num intervalo de tempo de sete dias (Tabela 11), pelo que se pode considerar que, após o aparecimento do primeiro alimento contaminado ocorreu uma limpeza eficaz das instalações e equipamentos de maneira a eliminar a bactéria Lm43. No entanto, ocorreu uma nova contaminação, provavelmente através da introdução de novas matérias primas na empresa, levando ao reaparecimento de *L. monocytogenes*, desta vez de uma linhagem diferente.

No seu conjunto, os dados obtidos sugerem que a deteção de *L. monocytogenes* nos produtos de determinadas empresas, estará associado a focos de contaminações distintos das matérias primas e, nalguns casos, dos equipamentos e instalações. Os resultados obtidos sugerem a necessidade destas empresas implementarem planos de controlo de qualidade das matérias primas, com monitorização da presença de *L. monocytogenes* nas matérias primas aquando do início do processo de produção. Este rastreio das matérias primas permitiria, por um lado, excluir as matérias primas responsáveis pelas contaminações e, por outro lado, ser instrumental para que os próprios fornecedores avaliassem a qualidade do seu produto, e implementassem medidas corretivas adequadas que poderiam resultar em certificados de controlo de qualidade das matérias primas, com óbvias vantagens para toda a cadeia de produção. Relativamente às empresas com casos que sugerem persistência de um foco de contaminação ao longo do tempo, para além da análise das matérias primas, devem ser implementadas medidas complementares de higienização no que diz respeito à limpeza e desinfeção dos equipamentos e superfícies de forma a eliminar totalmente a contaminação.

É ainda importante salientar que, ao considerar a origem animal do leite ou queijos analisados durante o estágio (Tabela 11) com resultado positivo para a presença de *L. monocytogenes*, verificou-se que apenas uma amostra não possuía na sua constituição leite de ovelha. Num estudo realizado em Portugal, Pintado et al. (2005) analisaram 63 queijos produzidos com leite de ovelha não pasteurizado na zona da Beira Baixa, com o objetivo de monitorizar a presença de *Listeria* spp. A espécie *L. monocytogenes* foi detetada em 29 (46%) isolados, dos quais 24 foram posteriormente serotipados (Pintado, Oliveira et al. 2005). Através desta técnica foi possível determinar que 96% dos isolados pertencem à linhagem I (serovars 4b e 1/2b) e que apenas 4% dos isolados pertencem à linhagem II (serovar 1/2a). Estes resultados evidenciam uma elevada prevalência de serovars pertencentes à linhagem I em leite de ovelha, em detrimento de serovars da linhagem II, ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, onde 72% dos isolados de *L. monocytogenes* pertencem à linhagem II e apenas 28% à linhagem I. É importante notar que a linhagem II é frequentemente associada a casos de listeriose esporádica em humanos, e a linhagem I, geralmente associada a surtos de listeriose e a sequelas ao nível do sistema nervoso central. É, assim, urgente a implementação de boas práticas de manufatura e a revisão do plano de HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), de modo a eliminar focos de

contaminação de *L. monocytogenes* durante o processo de fabrico (Orsi, den Bakker et al. 2011, Melo, Andrew et al. 2015).

Embora os estudos de genotipagem realizados apresentem fragilidades, desde logo por não permitirem discriminar clones menos comuns de *L. monocytogenes* (Chenal-Francisque et al. 2015), a abordagem de identificação por sequenciação do gene 16S rRNA e genotipagem por duplex PCR realizada neste trabalho, demonstra a necessidade de rever o método utilizado no laboratório para a deteção e identificação de *L. monocytogenes* em amostras alimentares. Estudos de genotipagem mais detalhados permitiriam determinar inequivocamente o clone a que determinado isolado de *L. monocytogenes* pertence, resolvendo assim a incerteza sobre os resultados de persistência obtidos. De fato, saber se isolados de *L. monocytogenes* obtidos em amostras com diferentes origens, correspondem ou não à mesma linhagem, é fundamental para determinar a origem do(s) foco(s) de contaminação, permitindo que as empresas estabeleçam medidas mais apertadas, não só durante os processos de receção e armazenamento de matérias primas, mas também a nível da higiene dos processos.

## Ocorrência de *L. monocytogenes* em Portugal

Apesar de relativamente rara, a listeriose humana é uma das doenças de origem alimentar com taxas de mortalidade e hospitalização mais elevadas, que pode ter consequências graves particularmente nas parturientes e nos mais idosos (Doganay 2003, Clauss and Lorber 2008, Almeida 2009, WHO 2015). Para que as estratégias de redução das contaminações de *L. monocytogenes* sejam eficazes, é necessário conhecer a ocorrência e persistência destes microrganismos em cada tipo de alimento, a sua distribuição no ambiente e em unidades de processamento alimentar. É, por isso, evidente o interesse em desenvolver estudos que permitam avaliar estas variáveis e que sejam informativos para levar a um controlo mais eficiente da proliferação de *L. monocytogenes* em alimentos.

Grande parte dos estudos realizados em Portugal acerca de *L. monocytogenes* têm como propósito investigar a incidência desta bactéria em amostras alimentares, geralmente com posterior caracterização por serotipagem e/ou genotipagem com diferentes objetivos (Duarte G. 1995, Guerra, McLauchlin et al. 2001, Mena, Almeida et al. 2004, Azevedo, Regalo et al. 2005, Almeida, Morvan et al. 2010, Magalhaes, Almeida et al. 2015, Henriques, Cristino et al. 2017). Alguns desses estudos focam a sua pesquisa essencialmente na análise de queijos, uma vez que este tipo de matriz alimentar tem sido constantemente implicado em surtos e em casos de listeriose esporádica (Pintado, Oliveira et al. 2005, Kongo, Malcata et al. 2006, Leite, Rodrigues et al. 2006, Almeida, Figueiredo et al. 2007, Gameiro, Ferreira-Dias et al. 2007, Almeida, Magalhaes et al. 2013, Magalhaes, Almeida et al. 2015).

Não deve também ser negligenciada a pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de antibióticos em humanos e animais, que se sabe promover o aparecimento de bactérias resistentes, incluindo espécies de *Listeria* que eram consideradas suscetíveis a todos os antibióticos, com exceção para cefalosporinas e fosfomicina (Hof 1991, Hof, Nichterlein et al. 1997, Charpentier and Courvalin 1999). É, assim, de extrema relevância a realização de estudos que descrevam a resistência antimicrobiana em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e amostras clínicas, existindo já algumas publicações com origem em Portugal dedicados a este tópico (Antunes, Reu et al. 2002, Ferreira, Barbosa et al. 2011, Barbosa, Magalhaes et al. 2013).

## Conclusões

Este trabalho conciliou a experiência adquirida nas rotinas da análise microbiológica de alimentos num laboratório certificado para o efeito, Laboratório Brito Rocha Lda., com a aplicação complementar e inovadora de abordagens moleculares que dão resposta efetiva a questões pertinentes que os métodos atualmente certificados não são capazes, como a determinação da origem das contaminações. Se é certo que algumas destas abordagens moleculares poderiam ser consideradas, no passado, um ónus financeiro não sustentável, os custos atuais destes métodos são reduzidos, e arrisco-me a dizer, inferior ao que resulta do prejuízo financeiro da exclusão comercial de um produto por contaminação. Sendo verdade que os métodos atualmente certificados para a análise de alimentos ainda não incorporem, na sua generalidade, a obrigatoriedade de análises mais finas, os enormes avanços nesta área e as evidentes limitações dos métodos certificados, levarão a que num futuro próximo as agências de regulamentação internacional para a segurança alimentar, venham a sugerir a necessidade de rever a certificação dos métodos de análise de alimentos.

Por último, seria ainda de grande interesse a criação de uma base de dados que compilasse os resultados de todas as análises microbiológicas realizadas relativamente a alimentos, águas, superfícies e manipuladores, feitas pelos laboratórios. Este recurso permitiria determinar alguns parâmetros informativos, nomeadamente a incidência de determinado microrganismo em alimentos/águas, contribuindo para a vigilância epidemiológica de agentes patogénicos.

## Normas da *International Organization for Standardization* (ISO)

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NP 1828:1982     | Colheita de amostras para análise microbiológica                                                                                                                                                                                                    |
| NP 3277-1:1987   | Contagem de bolores e leveduras. Parte 1: Incubação a 25 °C                                                                                                                                                                                         |
| ISO 11290-1:1996 | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> . Part 1:Detection method                                                                                     |
| NP 4343:1998     | Pesquisa e quantificação de <i>Estafilococos</i>                                                                                                                                                                                                    |
| ISO 6222:1999    | Water quality - Enumeration of culturable micro-organisms. Colony count by inoculation in a nutrient agar culture medium                                                                                                                            |
| ISO 7899-2:2000  | Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2: Membrane filtration method                                                                                                                                             |
| ISO 16649-2:2001 | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> - Part 2: Colony-count technique at 44 degrees °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide |
| ISO 6579:2002    | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp.                                                                                                                                      |
| NP 4400-1:2002   | - Regras gerais para contagem de <i>Estafilococos</i> coagulase positiva. Parte 1 - Técnica com confirmação de colónias                                                                                                                             |
| ISO 7937:2004    | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> . Colony-count technique                                                                                                   |
| ISO 21528-2:2004 | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of <i>Enterobacteriaceae</i> . Part 2: Colony-count method                                                                                    |

|                  |                                                                                                                                                                                                                              |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ISO 4832:2006    | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms. Colony-count technique                                                                                                  |
| ISO 16266:2006   | Water quality - Detection and enumeration of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . Method by membrane filtration                                                                                                                   |
| ISO 19458:2006   | Water quality - Sampling for microbiological analysis                                                                                                                                                                        |
| ISO 6887-2:2017  | Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products                 |
| ISO 6887-3:2017  | Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products              |
| ISO 6887-5:2010  | Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products |
| ISO 6887-6: 2013 | Microbiology of food and animal feed - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products           |
| ISO 14189:2013   | Water quality - Enumeration of <i>Clostridium perfringens</i> . Method using membrane filtration                                                                                                                             |
| ISO 9308-1:2014  | Water quality - Enumeration of <i>Escherichia coli</i> and coliform bacteria. Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora                                                              |
| ISO 16140-2:2016 | Microbiology of the food chain - Method validation. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method                                                                      |
| ISO 6887-1:2017  | Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part                                                                                 |

1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

ISO 6887-4:2017      Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 4: Specific rules for the preparation of miscellaneous products

## Referências Bibliográficas

AESBUC/UCP (2003). "Segurança alimentar dos queijos tradicionais."

AFNOR (2017). "Validation study according the ISO 16140-2 :2016 - *Listeria* Precip (Detection method) for *Listeria monocytogenes* detection in all food products and environmental samples."

Akhtar, S., M. R. Sarker and A. Hossain (2014). "Microbiological food safety: a dilemma of developing societies." Crit Rev Microbiol **40**(4): 348-359.

Almeida, G., A. Figueiredo, M. Rola, R. M. Barros, P. Gibbs, T. Hogg and P. Teixeira (2007). "Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety." J Food Prot **70**(7): 1710-1716.

Almeida, G., R. Magalhaes, L. Carneiro, I. Santos, J. Silva, V. Ferreira, T. Hogg and P. Teixeira (2013). "Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants." Int J Food Microbiol **167**(3): 303-309.

Almeida, G., A. Morvan, R. Magalhaes, I. Santos, T. Hogg, A. Leclercq and P. Teixeira (2010). "Distribution and characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates in Portugal, 1994-2007." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**(10): 1219-1227.

Almeida, G. N. M., R. B.; Barbosa, J. B.; Hogg, T. A.; Teixeira, P. C. (2009). "Listeriose em Portugal: 2004-2007." RPDI - Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas **5**: p90-94.

Amaya-Villar, R., E. Garcia-Cabrera, E. Sulleiro-Igual, P. Fernandez-Viladrich, D. Fontanals-Aymerich, P. Catalan-Alonso, C. Rodrigo-Gonzalo de Liria, A. Coloma-Conde, F. Grill-Diaz, A. Guerrero-Espejo, J. Pachon and G. Prats-Pastor (2010). "Three-year multicenter surveillance of community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults." BMC Infect Dis **10**: 324.

Angelidis, A. S., M. S. Kalamaki and S. S. Georgiadou (2015). "Identification of non-*Listeria* spp. bacterial isolates yielding a beta-D-glucosidase-positive phenotype on Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti (ALOA)." Int J Food Microbiol **193**: 114-129.

Antony, R., K. P. Krishnan, S. Thomas, W. P. Abraham and M. Thamban (2009). "Phenotypic and molecular identification of *Cellulosimicrobium cellulans* isolated from Antarctic snow." Antonie Van Leeuwenhoek **96**(4): 627-634.

Antunes, P., C. Reu, J. Sousa, N. Pestana and L. Peixe (2002). "Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* isolated from poultry carcasses in Porto, Portugal." Journal of Food protection **65**(12): 1888-1893.

Arslan, S. and F. Özdemir (2008). "Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese." Food Control **19**(4): 360-363.

Asefa, D. T., C. F. Kure, R. O. Gjerde, M. K. Omer, S. Langsrud, T. Nesbakken and I. Skaar (2010). "Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility." Int J Food Microbiol **140**(2-3): 131-135.

Autio, T., S. Hielm, M. Miettinen, A. M. Sjöberg, K. Aarnisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm and H. Korkeala (1999). "Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing." Appl Environ Microbiol **65**(1): 150-155.

Axel, C., E. Zannini and E. K. Arendt (2017). "Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension." Crit Rev Food Sci Nutr **57**(16): 3528-3542.

Azevedo, I., M. Regalo, C. Mena, G. Almeida, L. Carneiro, P. Teixeira, T. Hogg and P. Gibbs (2005). "Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal." Food Control **16**(2): 121-124.

Bakalidou, A., P. Kampf, M. Berchtold, T. Kuhnigk, M. Wenzel and H. König (2002). "Cellulosimicrobium variabile sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*." Int J Syst Evol Microbiol **52**(Pt 4): 1185-1192.

Barbosa, J., R. Magalhaes, I. Santos, V. Ferreira, T. R. Brandao, J. Silva, G. Almeida and P. Teixeira (2013). "Evaluation of antibiotic resistance patterns of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates in Portugal." Foodborne Pathog Dis **10**(10): 861-866.

Barocci, S., A. Mancini, B. Canovari, E. Petrelli, E. Sbriscia-Fioretti, A. Licci, S. D'Addesa, G. Petrini, M. Giacomini, A. Renzi, A. Migali and S. Briscolini (2015). "*Listeria monocytogenes* meningitis in an immunocompromised patient." New Microbiol **38**(1): 113-118.

Baylis C., U. M., Joosten H. and Davies A. (2011). "The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry." ILSI Europe.

Becker, B., S. Schuler, M. Lohneis, A. Sabrowski, G. Curtis and W. Holzapfel (2006). "Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1." International Journal of Food Microbiology **109**(1): 127-131.

Ben-Yehuda, A. and M. E. Weksler (1992). "Host resistance and the immune system." Clinics in geriatric medicine **8**(4): 701-711.

Berg, G. (1978). "The indicator system. In Indicators of Viruses in Water and Food." Ann Arbor Science Publishers: 1-13.

Biolife (2010). "ALOA - Powder medium, selective and enrichment supplements and ready to use plates for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* in foods and animal feeding stuffs."

Bortolussi, R. (2008). "Listeriosis: a primer." CMAJ : Canadian Medical Association Journal **179**(8): 795-797.

Brouwer, M., D. v. d. Beek, S. Heckenberg, L. Spanjaard and J. Gans (2006). "Community-Acquired *Listeria monocytogenes* Meningitis in Adults." Clinical Infectious Diseases **43**(10): 1233-1238.

Brown, J. M., A. G. Steigerwalt, R. E. Morey, M. I. Daneshvar, L. J. Romero and M. M. McNeil (2006). "Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 4): 801-804.

Bryan, F. and M. Doyle (1995). "Health Risks and Consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Poultry." Journal of Food Protection **58**(3): 326-344.

Brynstad, S. and P. E. Granum (2002). "*Clostridium perfringens* and foodborne infections." Int J Food Microbiol **74**(3): 195-202.

Bubert, A., S. Kohler and W. Goebel (1992). "The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction." Appl Environ Microbiol **58**(8): 2625-2632.

Buchanan, R. L., L. G. M. Gorris, M. M. Hayman, T. C. Jackson and R. C. Whiting (2017). "A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments." Food Control **75**: 1-13.

Buchanan, R. L., J. L. Smith and W. Long (2000). "Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization." Int J Food Microbiol **58**(3): 159-172.

Byappanahalli, M. N., M. B. Nevers, A. Korajkic, Z. R. Staley and V. J. Harwood (2012). "Enterococci in the environment." Microbiol Mol Biol Rev **76**(4): 685-706.

Cabellos, C., R. Verdaguer, M. Olmo, N. Fernandez-Sabe, M. Císnal, J. Ariza, F. Gudiol and P. F. Viladrich (2009). "Community-acquired bacterial meningitis in elderly patients: experience over 30 years." Medicine (Baltimore) **88**(2): 115-119.

Cartwright, E. J., K. A. Jackson, S. D. Johnson, L. M. Graves, B. J. Silk and B. E. Mahon (2013). "Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008." Emerg Infect Dis **19**(1): 1-9; quiz 184.

CE (2002). "Regulamento (CE) N.º 178/2002 do Parlamento Europeu e do Conselho de 28 de Janeiro de 2002, que determina os princípios e normas gerais da legislação alimentar, cria a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos e estabelece procedimentos em matéria de segurança dos géneros alimentícios." Jornal Oficial das Comunidades Europeias.

CE (2007). Regulamento (CE) N.º 1441/2007 da Comissão de 5 de Dezembro de 2007. Jornal Oficial da União Europeia.

Ceci, M., G. Delpech, M. Sparo, V. Mezzina, S. Sanchez Bruni and B. Baldaccini (2015). "Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*." J Infect Dev Ctries **9**(11): 1195-1203.

Charpentier, E. and P. Courvalin (1999). "Antibiotic Resistance in *Listeria* spp." Antimicrobial Agents and Chemotherapy **43**(9): 2103-2108.

Chen, Y., W. H. Ross, M. J. Gray, M. Wiedmann, R. C. Whiting and V. N. Scott (2006). "Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages." J Food Prot **69**(2): 335-344.

Chen, Y., W. H. Ross, V. N. Scott and D. E. Gombas (2003). "Listeria monocytogenes: low levels equal low risk." J Food Prot **66**(4): 570-577.

Chenal-Francisque, V., M. M. Maury, M. Lavina, M. Touchon, A. Leclercq, M. Lecuit and S. Brisse (2015). "Clonogrouping, a Rapid Multiplex PCR Method for Identification of Major Clones of *Listeria monocytogenes*." J Clin Microbiol **53**(10): 3355-3358.

Clauss, H. E. and B. Lorber (2008). "Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*." Curr Infect Dis Rep **10**(4): 300-306.

Cocolin, L., K. Rantsiou, L. Iacumin, C. Cantoni and G. Comi (2002). "Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods." Appl Environ Microbiol **68**(12): 6273-6282.

Dikici, A. and M. Calicioglu (2013). "Survival of *Listeria monocytogenes* during Production and ripening of traditional Turkish Savak tulum cheese and in synthetic gastric fluid." J Food Prot **76**(10): 1801-1805.

Doganay, M. (2003). "Listeriosis: clinical presentation." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(3): 173-175.

Dominguez, S. A. and D. W. Schaffner (2009). "Survival of salmonella in processed chicken products during frozen storage." J Food Prot **72**(10): 2088-2092.

Duarte G., V. V. M. (1995). "Ocorrência de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em pescado fumado a frio em Portugal." Arquivos do Instituto Nacional de Saúde.

Dzupova, O., H. Rozsypal, D. Smiskova and J. Benes (2013). "*Listeria monocytogenes* meningitis in adults: the Czech Republic experience." Biomed Res Int **2013**: 846186.

EFSA (2016). "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015." EFSA Journal **14**(12): e04634-n/a.

FAO/WHO (2003). "Hazard characterization for pathogens in food and water guidelines."

Farber, J. M., E. Daley, F. Coates, N. Beausoleil and J. Fournier (1991). "Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model." J Clin Microbiol **29**(11): 2606-2608.

Farber, J. M. and P. I. Peterkin (1991). "*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen." Microbiol Rev **55**(3): 476-511.

FDA/FSIS (2003). "Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods." Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Centers for Disease Control and Prevention

Ferreira, V., J. Barbosa, J. Silva, M. Felício, C. Mena, T. Hogg, P. Gibbs and P. Teixeira (2007). "Characterisation of alheiras, traditional sausages produced in the North of Portugal, with respect to their microbiological safety." Food Control **18**(5): 436-440.

Ferreira, V., J. Barbosa, M. Stasiewicz, K. Vongkamjan, A. Moreno Switt, T. Hogg, P. Gibbs, P. Teixeira and M. Wiedmann (2011). "Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal." Appl Environ Microbiol **77**(8): 2701-2715.

Ferreira, V., M. Wiedmann, P. Teixeira and M. J. Stasiewicz (2014). "Listeria monocytogenes persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health." J Food Prot **77**(1): 150-170.

Fox, E., K. Hunt, M. O'Brien and K. Jordan (2011). "Listeria monocytogenes in Irish Farmhouse cheese processing environments." Int J Food Microbiol **145 Suppl 1**: S39-45.

Friesema, I. H., S. Kuiling, A. van der Ende, M. E. Heck, L. Spanjaard and W. van Pelt (2015). "Risk factors for sporadic listeriosis in the Netherlands, 2008 to 2013." Euro Surveill **20**(31).

Gameiro, N., S. Ferreira-Dias, M. Ferreira and L. Brito (2007). "Evolution of Listeria monocytogenes populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese." Food Control **18**(10): 1258-1262.

Gómez, D., S. McGuinness, K. Reddington, J. O'Grady, J. Yangüela and T. Barry (2013). "Evaluation of a novel Listeria enrichment broth combined with a real-time PCR diagnostics assay for the specific detection of Listeria monocytogenes in RTE pork products." International Journal of Food Science & Technology **48**(5): 1103-1108.

Goulet, V., C. Jacquet, P. Martin, V. Vaillant, E. Laurent and H. de Valk (2006). "Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003." Euro Surveill **11**(6): 79-81.

Goulet, V., L. King, V. Vaillant and H. de Valk (2013). "What is the incubation period for listeriosis?" BMC Infectious Diseases **13**(1): 11.

Grabow, W. O. K. (1996). "Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control." Water SA **22**: 193-202.

Grass, J. E., L. H. Gould and B. E. Mahon (2013). "Epidemiology of Foodborne Disease Outbreaks Caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998–2010." Foodborne Pathog Dis **10**(2): 131-136.

Greenwood, M., C. Willis, P. Doswell, G. Allen and K. Pathak (2005). "Evaluation of chromogenic media for the detection of Listeria species in food." J Appl Microbiol **99**(6): 1340-1345.

Guerra, M. M., J. McLauchlin and F. A. Bernardo (2001). "Listeria in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal." Food Microbiology **18**(4): 423-429.

Haller, L., G. Hutton and J. Bartram (2007). "Estimating the costs and health benefits of water and sanitation improvements at global level." J Water Health **5**(4): 467-480.

Henriques, A. R., J. M. Cristino and M. J. Fraqueza (2017). "Genetic Characterization of Listeria monocytogenes Isolates from Industrial and Retail Ready-to-Eat Meat-Based Foods and Their Relationship with Clinical Strains from Human Listeriosis in Portugal." J Food Prot **80**(4): 551-560.

Hof, H. (1991). "Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis." Infection **19 Suppl 4**: S229-233.

Hof, H., T. Nichterlein and M. Kretschmar (1997). "Management of listeriosis." Clinical Microbiology Reviews **10**(2): 345-357.

Iannetti, L., V. Acciari, S. Antoci, N. Addante, L. Bardasi, S. Bilei, P. Calistri and F. Cito (2016). "Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods in Italy: Prevalence of contamination at retail and characterisation of strains from meat products and cheese." Food Control **68**: 55-61.

INSA (2005). "Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração." Revista da Ordem dos Farmacêuticos **64**: 66-68.

Ivanek, R., Y. T. Grohn and M. Wiedmann (2006). "Listeria monocytogenes in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling." Foodborne Pathog Dis **3**(4): 319-336.

Johansson, T., L. Rantala, L. Palmu and T. Honkanen-Buzalski (1999). "Occurrence and typing of Listeria monocytogenes strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant." International Journal of Food Microbiology **47**(1): 111-119.

Kongo, J. M., F. X. Malcata, A. J. Ho and M. Wiedmann (2006). "Detection and characterization of Listeria monocytogenes in Sao Jorge (Portugal) cheese production." J Dairy Sci **89**(11): 4456-4461.

Kuriyan, A. E., J. Sridhar, H. W. Flynn, W. E. Smiddy, T. A. Albin, A. M. Berrocal, R. K. Forster, P. J. Belin and D. Miller (2014). "Endophthalmitis Caused by Enterococcus faecalis: Clinical Features, Antibiotic Sensitivities, and Outcomes." Am J Ophthalmol **158**(5): 1018-1023.e1011.

Lamont, R. F., J. Sobel, S. Mazaki-Tovi, J. P. Kusanovic, E. Vaisbuch, S. K. Kim, N. Uldbjerg and R. Romero (2011). "Listeriosis in Human Pregnancy: a systematic review." Journal of perinatal medicine **39**(3): 227-236.

Lane, D. J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing." E. Stachebrandt e M. Goodfellow, Editors: Nucleic acid techniques in bacterial systematics: 115-175.

Langille, M. G. I., J. Zaneveld, J. G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J. A. Reyes, J. C. Clemente, D. E. Burkepile, R. L. Vega Thurber, R. Knight, R. G. Beiko and C. Huttenhower (2013). "Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences." Nat Biotech **31**(9): 814-821.

Le Loir, Y., F. Baron and M. Gautier (2003). "Staphylococcus aureus and food poisoning." Genet Mol Res **2**(1): 63-76.

Leclercq, A. (2004). Atypical colonial morphology and low recoveries of Listeria monocytogenes strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L. mono and ALOA solid media.

Lecuit, M., S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet and P. Cossart (2001). "A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier." Science **292**(5522): 1722-1725.

Legan, J. D. (1993). "Mould spoilage of bread: the problem and some solutions." International Biodeterioration & Biodegradation **32**(1): 33-53.

Leite, P., R. Rodrigues, M. Ferreira, G. Ribeiro, C. Jacquet, P. Martin and L. Brito (2006). "Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans." Int J Food Microbiol **106**(2): 111-121.

Lianou, A. and J. N. Sofos (2007). "A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments." J Food Prot **70**(9): 2172-2198.

Lindstrom, M., A. Heikinheimo, P. Lahti and H. Korkeala (2011). "Novel insights into the epidemiology of *Clostridium perfringens* type A food poisoning." Food Microbiol **28**(2): 192-198.

Linton, M., A. B. Mackle, V. K. Upadhyay, A. L. Kelly and M. F. Patterson (2008). "The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure." Innovative Food Science & Emerging Technologies **9**(4): 423-428.

Liu, D. (2013). "Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae." Microbiol Insights **6**: 59-69.

Magalhaes, R., G. Almeida, V. Ferreira, I. Santos, J. Silva, M. M. Mendes, J. Pita, G. Mariano, I. Mancio, M. M. Sousa, J. Farber, F. Pagotto and P. Teixeira (2015). "Cheese-related listeriosis outbreak, Portugal, March 2009 to February 2012." Euro Surveill **20**(17).

Manero, A. and A. R. Blanch (1999). "Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4425-4430.

McLauchlin, J. (1997). "The identification of *Listeria* species." International Journal of Food Microbiology **38**(1): 77-81.

McLauchlin, J., R. T. Mitchell, W. J. Smerdon and K. Jewell (2004). "*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods." Int J Food Microbiol **92**(1): 15-33.

Melo, J., P. W. Andrew and M. L. Faleiro (2015). "*Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses." Food Research International **67**: 75-90.

Mena, C., G. Almeida, L. Carneiro, x, sa, P. Teixeira, T. Hogg and P. A. Gibbs (2004). "Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal." Food Microbiology **21**(2): 213-216.

Meng, J. and M. P. Doyle (1998). "Emerging and evolving microbial foodborne pathogens." Bulletin de l'Institut Pasteur **96**(3): 151-163.

Meng, J. and M. P. Doyle (2002). "Introduction. Microbiological food safety." Microbes Infect **4**(4): 395-397.

Miettinen, A., J. Husu and J. Tuomi (1990). "Serum antibody response to *Listeria monocytogenes*, listerial excretion, and clinical characteristics in experimentally infected goats." J Clin Microbiol **28**(2): 340-343.

Ministério do Ambiente (1997). Decreto Regulamentar n.º 5/97 de 31 de Março

Ministério do Ambiente (2007). Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto. Diário da República: 5747-5765.

Mižáková, A., M. Pipová and P. Turek (2002). "The occurrence of moulds in fermented raw meat products." Czech J. Food Sci **20**(3): 89-94.

Møretrø, T., & Langsrud, S. (2004). "*Listeria monocytogenes*: Biofilm formation and persistence in food-processing environments. ." Biofilms **1**(2): 107-121.

Murray, E. G. D., R. A. Webb and M. B. R. Swann (1926). "A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.)." The Journal of Pathology and Bacteriology **29**(4): 407-439.

Mylonakis, E., M. Paliou, E. L. Hohmann, S. B. Calderwood and E. J. Wing (2002). "Listeriosis during pregnancy: a case series and review of 222 cases." Medicine (Baltimore) **81**(4): 260-269.

Nelson, K. E., D. Warren, A. M. Tomasi, T. N. Raju and D. Vidyasagar (1985). "Transmission of neonatal listeriosis in a delivery room." Am J Dis Child **139**(9): 903-905.  
Notermans, S. and E. Hoornstra (2000). "Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure." Int J Food Microbiol **62**(3): 223-229.

O'Driscoll, B., C. G. Gahan and C. Hill (1996). "Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence." Appl Environ Microbiol **62**(5): 1693-1698.

Ooi, S. T. and B. Lorber (2005). "Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*." Clinical Infectious Diseases **40**(9): 1327-1332.

Orsi, R. H., H. C. den Bakker and M. Wiedmann (2011). "*Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics." Int J Med Microbiol **301**(2): 79-96.

Osman, K. M., T. R. Zolnikov, A. Samir and A. Orabi (2014). "Prevalence, pathogenic capability, virulence genes, biofilm formation, and antibiotic resistance of *Listeria* in goat and sheep milk confirms need of hygienic milking conditions." Pathog Glob Health **108**(1): 21-29.

Ottaviani, F., Ottaviani, M., Agosti, M. (1997). "Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*. ." Quimper Froid Symposium Proceedings: 16-18.

Oxoid (2004). "ONE Broth–*Listeria* - culture media."

Oxoid. (2017). "CHROMOGENIC LISTERIA AGAR - CM1084." Retrieved 15/07/2017, from [http://www.oxoid.com/uk/blue/prod\\_detail/prod\\_detail.asp?pr=SR0226&org=91&c=uk&lang=en](http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0226&org=91&c=uk&lang=en).

- Padungtod, P. and J. B. Kaneene (2006). "Salmonella in food animals and humans in northern Thailand." Int J Food Microbiol **108**(3): 346-354.
- Pagliano, P., V. Attanasio, M. Rossi, M. A. Carleo, N. Carannante, T. Ascione, F. Tuccillo and F. Fraganza (2015). "Listeria monocytogenes meningitis in the elderly: Distinctive characteristics of the clinical and laboratory presentation." J Infect **71**(1): 134-136.
- Pamer, E. G. (2004). "Immune responses to Listeria monocytogenes." Nat Rev Immunol **4**(10): 812-823.
- Petran, R. L. and K. M. J. Swanson (1993). "Simultaneous Growth of Listeria monocytogenes and Listeria innocua." Journal of Food Protection **56**(7): 616-618.
- Pine, L., G. B. Malcolm and B. D. Plikaytis (1990). "Listeria monocytogenes intragastric and intraperitoneal approximate 50% lethal doses for mice are comparable, but death occurs earlier by intragastric feeding." Infect Immun **58**(9): 2940-2945.
- Pintado, C. M. B. S., A. Oliveira, M. E. Pampulha and M. A. S. S. Ferreira (2005). "Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes isolated from soft cheese." Food Microbiology **22**(1): 79-85.
- Pirie, J. H. H. (1940). "Listeria: Change of Name for a Genus of Bacteria." Nature **145**: 264.
- Portnoy, D. A., V. Auerbuch and I. J. Glomski (2002). "The cell biology of Listeria monocytogenes infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity." J Cell Biol **158**(3): 409-414.
- Pouillot, R., K. Hoelzer, Y. Chen and S. B. Dennis (2015). "Listeria monocytogenes dose response revisited--incorporating adjustments for variability in strain virulence and host susceptibility." Risk Anal **35**(1): 90-108.
- Rocourt, J., P. BenEmbarek, H. Toyofuku and J. Schlundt (2003). "Quantitative risk assessment of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach." FEMS Immunol Med Microbiol **35**(3): 263-267.
- Ronholm, J., N. Nasheri, N. Petronella and F. Pagotto (2016). "Navigating Microbiological Food Safety in the Era of Whole-Genome Sequencing." Clin Microbiol Rev **29**(4): 837-857.
- Rudolf, M. and S. Scherer (2001). "High incidence of Listeria monocytogenes in European red smear cheese." International Journal of Food Microbiology **63**(1): 91-98.
- Sahu, M., M. Rahamathulla, B. Harish and S. Parija (2012). Neonatal septicemia due to Listeria monocytogenes. Sahu M, Parveen M, Harish BN, Parija SC IJRRMS 2012;2(2)33-5.
- Sauders, B. D., K. Mangione, C. Vincent, J. Schermerhorn, C. M. Farchione, N. B. Dumas, D. Bopp, L. Kornstein, E. D. Fortes, K. Windham and M. Wiedmann (2004). "Distribution of Listeria monocytogenes molecular subtypes among human and food isolates from New York State shows persistence of human disease--associated Listeria monocytogenes strains in retail environments." J Food Prot **67**(7): 1417-1428.

Schoder, D., P. Rossmanith, K. Glaser and M. Wagner (2012). "Fluctuation in contamination dynamics of *L. monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010." Int J Food Microbiol **157**(3): 326-331.

Siegman-Igra, Y., R. Levin, M. Weinberger, Y. Golan, D. Schwartz, Z. Samra, H. Konigsberger, A. Yinnon, G. Rahav, N. Keller, N. Bisharat, J. Karpuch, R. Finkelstein, M. Alkan, Z. Landau, J. Novikov, D. Hassin, C. Rudnicki, R. Kitzes, S. Ovadia, Z. Shimoni, R. Lang and T. Shohat (2002). "*Listeria monocytogenes* Infection in Israel and Review of Cases Worldwide." Emerging Infectious Diseases **8**(3): 305-310.

Sigma, M. "Technical Data Sheet - Chromocult® *Listeria* Agar (Base) acc. OTTAVIANI and AGOSTI acc. ISO 11290."

Silk, B. J. (2013). "Vital signs: *Listeria* illnesses, deaths, and outbreaks--United States, 2009-2011." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **62**(22): 448-452.

Silveira, L. M., A.; Machado, J. (2013). "Infeções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012." Boletim Epidemiológico Observações **2** (Supl 1): 14-16.

Simpson, R. J., T. W. Lowder, G. Spielmann, A. B. Bigley, E. C. LaVoy and H. Kunz (2012). "Exercise and the aging immune system." Ageing Res Rev **11**(3): 404-420.

Skogberg, K., J. Syrjänen, M. Jahkola, O.-V. Renkonen, J. Paavonen, J. Ahonen, S. Kontiainen, P. Ruutu and V. Valtonen (1992). "Clinical Presentation and Outcome of Listeriosis in Patients with and without Immunosuppressive Therapy." Clinical Infectious Diseases **14**(4): 815-821.

Smith, J. P., D. P. Daifas, W. El-Khoury, J. Koukoutsis and A. El-Khoury (2004). "Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **44**(1): 19-55.

Smith, M. A., K. Takeuchi, G. Anderson, G. O. Ware, H. M. McClure, R. B. Raybourne, N. Mytle and M. P. Doyle (2008). "Dose-Response Model for *Listeria monocytogenes*-Induced Stillbirths in Nonhuman Primates." Infection and Immunity **76**(2): 726-731.

Smith, M. A., K. Takeuchi, R. E. Brackett, H. M. McClure, R. B. Raybourne, K. M. Williams, U. S. Babu, G. O. Ware, J. R. Broderick and M. P. Doyle (2003). "Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths." Infect Immun **71**(3): 1574-1579.

Soni, D. K. and S. K. Dubey (2014). "Phylogenetic analysis of the *Listeria monocytogenes* based on sequencing of 16S rRNA and *hlyA* genes." Mol Biol Rep **41**(12): 8219-8229.

Stasiewicz, M. J., H. F. Oliver, M. Wiedmann and H. C. den Bakker (2015). "Whole-Genome Sequencing Allows for Improved Identification of Persistent *Listeria monocytogenes* in Food-Associated Environments." Appl Environ Microbiol **81**(17): 6024-6037.

Stelma, G. N., Jr., A. L. Reyes, J. T. Peeler, D. W. Francis, J. M. Hunt, P. L. Spaulding, C. H. Johnson and J. Lovett (1987). "Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice." J Clin Microbiol **25**(11): 2085-2089.

Stessl, B., W. Luf, M. Wagner and D. Schoder (2009). "Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*." J Appl Microbiol **106**(2): 651-659.

Temple, M. E. and M. C. Nahata (2000). "Treatment of listeriosis." Ann Pharmacother **34**(5): 656-661.

ThermoScientific (2013). "Making food safer according to ISO methods - Culture media and associated products for pathogen detection and enumeration."

Thimothe, J., K. K. Nightingale, K. Gall, V. N. Scott and M. Wiedmann (2004). "Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants." J Food Prot **67**(2): 328-341.

Troutt, H. F., J. C. Galland, B. I. Osburn, R. L. Brewer, R. K. Braun, J. A. Schmitz, P. Sears, A. B. Childers, E. Richey, E. Mather, M. Gibson, K. Murthy and A. Hogue (2001). "Prevalence of *Salmonella* spp in cull (market) dairy cows at slaughter." J Am Vet Med Assoc **219**(9): 1212-1215.

UNICEF, W. (2006). "Meeting the MDG drinking water and sanitation target : the urban and rural challenge of the decade."

Van de Beek, D., J. de Gans, L. Spanjaard, M. Weisfelt, J. B. Reitsma and M. Vermeulen (2004). "Clinical Features and Prognostic Factors in Adults with Bacterial Meningitis N." Engl J Med **351**.

Van Kessel, J. S., J. S. Karns, D. R. Wolfgang, E. Hovingh, B. M. Jayarao, C. P. Van Tassell and Y. H. Schukken (2008). "Environmental sampling to predict fecal prevalence of *Salmonella* in an intensively monitored dairy herd." J Food Prot **71**(10): 1967-1973.

Vangay, P., J. Steingrimsson, M. Wiedmann and M. J. Stasiewicz (2014). "Classification of *Listeria monocytogenes* persistence in retail delicatessen environments using expert elicitation and machine learning." Risk Anal **34**(10): 1830-1845.

Viegas, S. (2014). "Segurança alimentar - guia de boas práticas do consumidor." Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Vlaemynck, G., V. Lafarge and S. Scotter (2000). "Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium." J Appl Microbiol **88**(3): 430-441.

Ward, T. J., T. F. Ducey, T. Usgaard, K. A. Dunn and J. P. Bielawski (2008). "Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates." Appl Environ Microbiol **74**(24): 7629-7642.

Weisfelt, M., D. van de Beek, L. Spanjaard, J. B. Reitsma and J. de Gans (2006). "Community-acquired bacterial meningitis in older people." J Am Geriatr Soc **54**(10): 1500-1507.

Wemmenhove, E., I. Stampelou, A. C. M. van Hooijdonk, M. H. Zwietering and M. H. J. Wells-Bennik (2013). "Fate of *Listeria monocytogenes* in Gouda microcheese: No

growth, and substantial inactivation after extended ripening times." International Dairy Journal **32**(2): 192-198.

Wenger, J., B. Swaminathan and P. Hayes (1990). "Listeria monocytogenes Contamination of Turkey Franks: Evaluation of a Production Facility." Journal of Food Protection **53**(12): 1015-1019.

WHO (2001). World Health Organization. Water Quality: Guidelines, Standards and Health. IWA Publishing, London, UK. G. W. O. K. Ashbolt N.J., Snozzi M.

WHO (2002). "The world health report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life."

WHO (2006). Guidelines for safe recreational water environments - Swimming pools and similar environments. Geneva. **2**.

WHO (2008). "Guidelines for drinking-water quality: incorporating 1st and 2nd addenda, Vol.1, Recommendations. – 3rd ed."

WHO (2011). Guidelines for drinking-water quality - Fourth Edition. W. H. Organization.

WHO. (2015). "WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths." Retrieved 10 de Julho de 2017, from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/foodborne-disease-estimates/en/>.

WHO/FAO (2004). "Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods - Microbiological risk assessment series 5, technical report."

Willis, C., T. Baalham, M. Greenwood and F. Presland (2006). "Evaluation of a new chromogenic agar for the detection of *Listeria* in food." Journal of Applied Microbiology **101**(3): 711-717.

Wolf, T. M., B. Cole, S. Fahrion, P. Norris and L. Coyne (1994). "Age and sex modulate effects of stress on the immune system: a multivariate analysis." Int J Neurosci **79**(1-2): 121-132.

Zhang, Y., E. Yeh, G. Hall, J. Cripe, A. A. Bhagwat and J. Meng (2007). "Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods." Int J Food Microbiol **113**(1): 47-53.

Ziadi, M., S. Mhir, R. Dubois-Dauphin, E. Chambellon, M. Yvon, P. Thonart and M. Hamdi (2016). Analysis of Volatile Compounds, Amino Acid Catabolism and Some Technological Properties of *Enterococcus faecalis* Strain SLT13 Isolated from Artisanal Tunisian Fermented Milk.

## Anexo I

Sequências parciais do gene 16s rRNA dos  
isolados de *Listeria monocytogenes*

## Lm1a

GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCG  
GGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGAT  
GGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
AGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
TATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
GATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAG  
TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCG  
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTG  
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
GAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC  
CACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGC  
TGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTG  
ACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC  
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTC  
GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCGGAT  
TGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGA  
TCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTC  
ACACCACGAGAG

## Lm1b

TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATGAGCCGCCTTCGCATGG  
GGGTGGTTGGAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCT  
TGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG  
AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG  
CCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTTCGGGTGTGTAACCTCTTTTCAGCAGGGAA  
GAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTCTGCGTCTGGTGTGAAAACCTCGAGGCT  
CAACCTCGAGCTTGTCATCGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAG  
ACTGGAATTCTTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC  
CGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGCAACTGACGCTGAGGAGCGAAAG  
CATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGT  
TGGGCACTAGGTGTGGGGCTCATTCACAGAGTTCCGTGCCGCAGCAAACG  
CATTAAGTGCCCCGCCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG  
AATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGC  
AACGCGAAGAACCCTTACCAAGGCTTGACATGCACGGGAAGCCACCAGAGA  
TGGTGGTCTCTTTGGACACTCGTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAG  
CTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGT  
CCCATGTTGCCAGCGGGTTATGCCGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGT  
CAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGTC  
TTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGT  
AAGGTGGAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGC  
AACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGC  
TGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCG

## Lm2

GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGG  
AAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTG  
AAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTA  
GTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGA

GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAG  
AACAAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGA  
CTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCC  
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC  
AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCC  
TTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCTTTCGGGGACAAAGTGACAGGT  
GGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCT  
AAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
TCATGCCCCCTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAA  
AGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGT  
TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG  
CCCCTCACACCACGAGAG

Lm3

GAGCTTGCTCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA  
ACCTGCCGTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAA  
TGATAGAGTGTGGCGCATGCCACGCCTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCG  
CTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCCTA  
CCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG  
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTT  
TCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTG  
CTTGTCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG  
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTT  
AACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGA  
GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACC  
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
GAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCA  
TTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAA  
TTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA  
CGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAG  
AGCTTTCCCTTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGC  
TCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGAT  
TTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGAAGTGGCGGTGCAAG  
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG  
GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGG  
TGGAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACT  
CGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGG  
TGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTT  
TGTAACACCCGAAG

Lm4a

GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCG  
GGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGAT  
GGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
AGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG

TATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
GATAAGAGTAAC TGCTTGTCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAG  
TGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCG  
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTG  
CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTGGT  
TTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC  
CACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA  
TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGA  
GCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTG  
ACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC  
CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTC  
GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCGGAT  
TGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGGA  
TCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCC

Lm\_4b

GACGGTTTTCGGCTGTGCTATAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  
GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGG  
TGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGC  
GTGAGTGAAGAAGGATTTTCGGTTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAAC  
AAGTACAGTAGTAAC TGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG  
TCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGAT  
GTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTT  
GAGTGCAGAAGAGGATAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG  
AGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTATCTGGTCTGTAAGTGA  
CACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG  
TCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTA  
GTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGGTCGCAAG  
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGT  
GGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCCGT  
TGACCACTGTAGAGATATAGTTTCCCTTCGGGGGCAACGGTGACAGGTG  
GTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC  
AACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTA  
AGGTGACTGCCGGTGACAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
TCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATACAA  
ACGGTTGCCAACTCGCGAGAGGGAGCTAATCCGATAAAGTCGTTCTCAGT  
TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCG

Lm5

GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGG  
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAGAGTGTGGCGCA  
TGCCACGCTCTTGAAAGATGGTTTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCG  
GGTGCAATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACT  
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTA  
TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG  
GTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATT  
GGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC

Lm6

TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG  
 GGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC  
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
 GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGA  
 CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT  
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTT  
 AGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGA  
 TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCATAA  
 AACCAATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC  
 CTTGTACACACCGCCC

GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGG  
 GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTTGGCGCA  
 TGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGC  
 GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT  
 AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
 ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
 GACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACT  
 GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACCTGCTTGTCCCTTGACGGTA  
 TCTAACCGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
 TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG  
 GTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATT  
 GGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTA  
 GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC  
 TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
 TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG  
 GGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
 GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCAC  
 AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA  
 GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGA  
 CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT  
 GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTT  
 AGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGA  
 TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
 ATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAA  
 AACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
 AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAT

Lm7

GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCG  
 GGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGAT  
 GGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
 AGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
 TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
 GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
 TATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
 GATAAGAGTAACCTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACAGAAAGCCACGG  
 CTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
 GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTG  
 AAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAG  
 TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
 TGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGC  
 TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
 ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCCCTTAGTG  
 CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT  
 GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT

TTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC  
 CACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA  
 TGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGA  
 GCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTG  
 ACTGCCGGTGCAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGC  
 CCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTC  
 GCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCGGAT  
 TGTAGGCTGCAACTCGCTTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGA  
 TCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCCGTC  
 ACACCACGAGAGTTT

Lm8

AACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGA  
 ATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATC  
 GCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCT  
 ACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  
 GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
 CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTT  
 TTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACT  
 GCTTGTCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC  
 AGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC  
 GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCT  
 TAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAG  
 AGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACAC  
 CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAG  
 CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
 TGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC  
 ATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA  
 ATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCA  
 ACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACA  
 GAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAG  
 CTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGA  
 TTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAA  
 GCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
 GGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAG  
 GTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAAC  
 TCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACG  
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTTACACACCGCCC

Lm9

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
 GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
 GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
 GGGTAATGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAG  
 TAGGGAAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
 ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
 ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
 AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGT  
 GCAGAAGAGGAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
 GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
 GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCA  
 CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGC  
 TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
 ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
 GGTTGTCGTGAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
 CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA

## Lm10

CTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCG  
CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACTATTCTCAGTTCGGATT  
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT  
CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGAAAGTGGAGT  
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTG  
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGACCGCAAGGTTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
GGTTGTCTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA  
CTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCG  
CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACTATTCTCAGTTCGGATT  
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT  
CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

## Lm11

CACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG  
TAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTT  
TCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGG  
TAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATG  
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATA  
AGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCA  
GAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG  
GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC  
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAA  
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACT  
CTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT  
TGTCGTCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGAAGT  
CCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGA  
AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTA  
GGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG  
CATGCCACGGTGAATACG

## Lm12

CACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCT  
TAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTT  
TCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGG  
TAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATG  
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATA  
AGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCA  
GAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG  
GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGC  
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAA  
TTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACT  
CTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGT  
TGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC  
AACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTACGTG  
CCGGTGCAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGTCGCGA  
AGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCGGATTGTA  
GGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAG  
CATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC  
CACGAGAG

## Lm13

AACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGA  
ATAATAAGTGGTGGCGCATGCCACGGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATC  
GCTTACAGATGGGCCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCT  
ACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG  
GACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC  
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTT  
TTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACT  
GCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGC  
GTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCT  
TAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAG  
AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGA  
TGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGC  
ATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGA  
ATTGACGGGGGCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCA  
ACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACA  
GAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGAG  
CTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTAA  
TTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTACTGCCGGTGCAA  
GCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAG  
GTGGAGCCAATCCCATAAAACCATTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAAC  
TCGCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACG  
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT  
TTGTAAACA

## Lm14

AAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTG  
AAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGTGCATTAGCTA

## Lm15

GTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGA  
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAG  
AACAAAGGATAAGAGTAACCTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATTTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGA  
CTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGC

TGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGA  
TAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAGATGGTTTTCGGCTATCGCTT  
ACAGATGGGCCCAGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCA  
AGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  
ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCG  
GATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACCTGCTT  
GTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA  
GCCGCGGTAACTACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAA  
AGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAAC  
CGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTG  
GAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGT  
GGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAG  
TGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTA  
AGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTG  
ACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGC  
GAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGC  
TTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTT  
AGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCG  
GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCT  
ACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGG  
AGCTAATCCCATAAAACATTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGCAACTCGC  
CTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGA  
ATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG

## Lm16

TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAGTGTGGCGCATGCC  
ACGCTTTTGAAGATGGTTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCAGCGTG  
CATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG  
GAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTG  
TTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACCTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCT  
TTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTG  
GTCGTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGT  
TTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAA  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGT

TAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTAGTT  
GGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGAC  
GTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG  
ATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACT  
ATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATC  
GCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  
TACACACCGCCC

Lm17

GGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATA  
CCGAATGATAAGATGTGGCGCATGCCACGCCTTTGAAAGATGGTTTCGGC  
TATCGCTTACAGATGGGCCCCGGTGCTTAGCTAGTTGGTAGGGTAATG  
GCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT  
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAA  
GGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGT  
AACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATT  
GGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCC  
GGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGAAAGTGGAGTGCAGAAGA  
GGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGA  
ACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCG  
AAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAA  
ACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA  
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAA  
AGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGA  
AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGA  
GACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTACAGGTGGTGCATGGTTGTCTG  
TCAGTCTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCC  
TTGATTTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGT  
GCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGA  
CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCG  
CGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTG  
CAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGC  
CACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGA  
GAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTAGGGT

Lm18

GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGG  
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCA  
TGCCACGCCTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCG  
GGTGCTTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGTACT  
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAGTGTCTTGTCCCTTGACGGTA  
TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG  
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG  
GTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATT  
GGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTC  
TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG  
GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCGCAC  
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCA  
GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGA  
CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGTCTGTGCTGAGATGTT  
GGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA

ATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAA  
AACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG

## Lm19

GGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGG  
AAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTG  
AAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTA  
GTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGA  
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGC  
CGCGTGTATGAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAG  
AACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAG  
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACGTAGGTGGCAAGCG  
TTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGA  
CTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAT'TCCACGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC  
TGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG  
TAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT'TAGGGGGTTTCCGCCCC  
TTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGC  
AAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA  
TGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACC'TTACCAGGTCTTGACATCC  
TTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGT  
GGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG  
CAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCT  
AAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCA  
TCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAA  
AGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAACTATTCTCAGT  
TCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAAT  
CGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG

## Lm20

TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGC  
CACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGT  
GCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTT  
GTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT'TAGGGGG  
TTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACC'TTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCACCTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAA  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGG  
TTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGT  
TGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAC  
TATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAAT  
CGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCC

## Lm21

TAACCTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGC  
CACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGT  
GCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC  
GGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTT  
GTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCT  
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTC  
TTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGA  
AACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCG  
GTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCT  
GGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA  
GATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGG  
TTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA  
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAG  
CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGT  
CTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGCAA  
AGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTGGG  
TTAAGTCCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGT  
TGGGCACCTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAAC  
TATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAAT  
CGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGT

## Lm22

GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGG  
GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCA  
TGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCG  
GGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT  
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT  
GACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACT  
GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTA  
TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG  
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG  
GTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATT  
GGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTC  
TCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG  
GGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG  
GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCAC  
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCA  
GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGA  
CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT  
GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTT  
AGTTGGGCACCTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGAGGAAGGTGGGGA  
TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA  
ATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAA  
AACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG  
AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC  
CTTGATACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG

## Lm23

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT

CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGT  
GCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGAGTGCCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC  
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
GGTTGTCTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA  
CTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCCG  
CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCCGATT  
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT  
CAGCATGCCAC

Lm24

GTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA  
TACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCG  
GCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAA  
TGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAG  
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGA  
GTAAGTGTCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA  
TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
CCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAA  
GAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAG  
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGCGCG  
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
AAACGATGAGTGCCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC  
TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC  
AAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC  
GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTG  
GAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT  
CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
CCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCG  
GTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT  
GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGC  
CGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTCTCAGTTCCGATTGTAGGC  
TGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAT  
GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

Lm25

GTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA  
TACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCG  
GCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAA  
TGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
CACTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAG  
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGA  
GTAAGTGTCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA

TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
 CCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAA  
 GAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAG  
 GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG  
 CGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
 AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC  
 TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC  
 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC  
 GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTG  
 GAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT  
 CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC  
 CCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCG  
 GTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTAT  
 GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGC  
 CGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGC  
 TGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAT  
 GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAC  
 GAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTA

Lm26

TAAACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
 GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
 GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
 GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
 CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
 TAGGGAACTCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGT  
 ATGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
 ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
 TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
 GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
 AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGT  
 GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
 GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
 GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
 CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCT  
 TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
 AAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
 TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
 ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
 GGTTGTCGTGAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
 CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA  
 CTGCCGCTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
 CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCG  
 CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCTATTTCTCAGTTCGGATT  
 GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT  
 CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA  
 CACCACGAGAGTT

Lm27

GTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAA  
 TACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCG  
 GCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAA  
 TGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  
 CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
 ATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAG  
 AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGA  
 GTAAGTGTGTTGCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTA  
 CGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTA  
 TTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCC  
 CCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAA  
 GAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAG

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|       | <p>GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCG<br/> CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT<br/> AAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGC<br/> TAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC<br/> AAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTC<br/> GAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTG<br/> GAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT<br/> CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC<br/> CCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCG<br/> GTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTAT<br/> GACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGC<br/> CGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGC<br/> TGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCAT<br/> GCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCAC<br/> GAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTAGGGTAACCTTTATGGAGCCAGCC<br/> CCCGAA</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Lm28  | <p>TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG<br/> GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG<br/> GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA<br/> GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT<br/> CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAG<br/> TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT<br/> ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG<br/> ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC<br/> TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG<br/> GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA<br/> AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGT<br/> GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT<br/> GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT<br/> GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA<br/> CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC<br/> TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG<br/> AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT<br/> TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC<br/> ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT<br/> GGTTGTCGTACGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG<br/> CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA<br/> CTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC<br/> CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCG<br/> CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATT<br/> GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT<br/> CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCA<br/> CACCACGAGAG</p> |
| Lm29  | <p>CAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCG<br/> AATGATAAAGTGTTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTAT<br/> CGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCC<br/> TACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG<br/> GGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT<br/> CCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGT<br/> TTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAC<br/> TGCTTGTCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC<br/> CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTG</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Lm30a | <p>AGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGT<br/> TAGTAACTGAACGTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAAC<br/> TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT<br/> TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGC</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

Lm30b

CCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAG  
AAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGG  
CTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCC  
GTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA  
GCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAAC  
TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAAT  
TCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTC  
TAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTT  
GTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCA  
ACCCTTATTGTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGC  
CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCT  
TATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTA  
GACCGGAGGTGATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCA  
GGGTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAG  
CACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC

AACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGC  
ATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTGCTGATGGATGGACCCGCGGTG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCTCACCAGGCCACGATGCATAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACC  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTG  
TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCTGACGGTATCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT  
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGT  
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTG  
TTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAA  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTT  
GGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GGAAGTACAACGAGTTCGCTAGACCGCGAGGTGATGCAAATCTCTTAAAGC  
TTCTCTCAGTTCCGATTGCGAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT  
GTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG

Lm31

GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCG  
GGGCTAATACCGAATGATAGAGTGTGGCGCATGCCACGCTCTTGAAAGAT  
GGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT  
AGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
TATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAG  
GATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC  
GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAAGTCTGATGTG  
AAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAG  
TGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TGTGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCG  
TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTG

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT<br>GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT<br>TTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC<br>CACTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Lm32 | AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTC<br>GGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAGTACTGCT<br>TGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC<br>AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA<br>AAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAA<br>CCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGT<br>GGAATCCACGTGTAGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Lm33 | CGGAGGAAGAGCTTGCTCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACA<br>CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTA<br>ATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTC<br>GGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTA<br>ATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC<br>ACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG<br>AATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAA<br>GAAGGTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAG<br>AGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT<br>ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTT<br>ATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC<br>CCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGA<br>AGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGA<br>GGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC<br>GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG<br>TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG<br>CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACT<br>CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT<br>CGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTT                                  |
| Lm34 | GTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCG<br>GGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGAT<br>GGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGT<br>AGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA<br>TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA<br>GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG<br>TATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAG<br>GATAAGAGTAAGTACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGG<br>CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC<br>GGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTG<br>AAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAG<br>TGCAGAAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA<br>TGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCG<br>TGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC<br>ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTG<br>CTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTT<br>GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT<br>TTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC<br>CACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCA<br>TGGTTGTCTGTC |
| Lm35 | GAGCTTGCTCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCA<br>ACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAA<br>TGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCG<br>CTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTA<br>CCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |

### Lm36

ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC  
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTT  
TCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACGT  
CTTGTCCTTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA  
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG  
TAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCGCTT  
AACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGA  
GTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACC  
AGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGC  
GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT  
GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCA  
TTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTC

TTGCTCTTCCAAAGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCT  
GCCGTGAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGAT  
AAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTA  
CAGATGGGCCCCGCGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAA  
GGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG  
AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA  
TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGG  
ATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAGTCTTG  
TCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA  
GCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGCGCTTAACC  
GGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGG  
AATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGT  
GCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA  
GCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  
CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG  
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC

### Lm37

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAACTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
ATAAGAGTAAGTGCCTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGACTGGAGT  
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCT  
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
GGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG  
CGCAACCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGA  
CTGCCGTTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAAGGGTCG  
CGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACTATTCTCAGTTCGGATT  
GTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGAT  
CAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCA

CACCACGAGAGTT

Lm38

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAACTCTTCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGT  
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT  
GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA  
CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTG  
TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG  
AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT  
TAATTCGAAGCAACGCCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC  
ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT  
GGTTGTCGTCAGCTCGTGTC

Lm39

CACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG  
TAATACCGAATGATAAAATGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTT  
TCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGG  
TAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG  
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG  
GGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATG  
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATA  
AGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAT  
TTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCA  
GAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTG  
GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAG  
GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGC  
AGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA  
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA  
TTCGAAGCAACGCCAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACT  
CTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGG

Lm40

TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATATGAGCCGTCCTCGCATGG  
GGGTGGTTGGAAAAGTTTTTCGGTCAGGGATGGGCTCGCGGCCTATCAGCT  
TGTTGGTGGGGTGATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG  
AGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACG  
CCGCGTGAGGGATGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAA  
GAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCGCGTCTGGTGTGAAAACCTCGAGGCT  
CAACCTCGAGCTTGCATCGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAG  
ACTGGAATTCTTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACAC  
CGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCGCAACTGACGCTGAGGAGCGAAAG  
CATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGT  
TGGGCACTAGGTGTGGGGCTCATTCACAGATTCCGTGCCGCGAGCAAACG  
CATTAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGG  
AATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGC

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | AACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGCACGGGAAGC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Lm41 | <p>TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG<br/> GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG<br/> GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA<br/> GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT<br/> CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG<br/> TAGGGAAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT<br/> ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG<br/> ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC<br/> TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG<br/> GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA<br/> AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGT<br/> GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT<br/> GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT<br/> GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA<br/> CGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC<br/> TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTG<br/> AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT<br/> TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC<br/> ACTC</p>                                                                        |
| Lm42 | <p>TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG<br/> GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG<br/> GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA<br/> GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT<br/> CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG<br/> TAGGGAAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT<br/> ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG<br/> ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC<br/> TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG<br/> GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA<br/> AAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGT<br/> GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT<br/> GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT<br/> GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA<br/> CGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGC<br/> TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCGTTGGGAGTACGACCGCAAGGTTG<br/> AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT<br/> TAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC<br/> ACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCAT<br/> GGTTGTCGTCAGCTCGTGT</p> |
| Lm43 | <p>GTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGAT<br/> GGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAA<br/> CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA<br/> CGGCCACAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC<br/> GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGT<br/> AAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCT<br/> TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG<br/> GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGCG<br/> CGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGA<br/> GGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC<br/> CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA<br/> GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC<br/> AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAA<br/> GTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGCACT<br/> CCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGG<br/> GCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAA</p>                                                                                                                                                                                                            |

Lm44a

CCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAAT  
GATAGAGTGTGGCGCATGCCACGCTCTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGC  
TTACAGATGGGCCCCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTAC  
CAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA  
CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG  
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTT  
CGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGC  
TTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG  
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGT  
AAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTA  
ACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAG  
TGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCA  
GTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCGCGAAAGCG  
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG  
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCAT  
TAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAAC  
GCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGA  
GCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCT  
CGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATT  
TTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACCTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGC  
CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGG  
CTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGT  
GGAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC  
GCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGT  
GAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGA

Lm44b

GCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTG  
TCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGC  
TCACCAAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT  
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT  
TCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGG  
TTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAA  
CTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGG  
GCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGG  
CTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGG  
AGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAAC  
ACCACTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAC TGACGCTGAGGCTCGAA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC  
GATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAAC  
GCATTAAAGCACTCCGCC TGGGAGGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAG  
GAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAG  
CAACGCGAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAC

Lm45

GGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGA  
GGTGGAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAA  
CTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCAC  
GGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG  
TTT

Lm46

GTGGCGCATGCCACGCTCTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGAT  
GGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAA  
CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC  
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGT  
AAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAACTGCTTGTCCCT  
TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG

GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCG  
CGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGA  
GGGTCAATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC  
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA  
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT  
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
GCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCC  
TTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGC  
CAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAA  
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC  
GTGCTACAAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAA  
TCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT  
GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG

Lm47

TAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAGAGT  
GTGGCGCATGCCACGCTCTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGAT  
GGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAA  
CGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACA  
CGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC  
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGT  
AAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAGTGTCTGCCCT  
TGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG  
GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCG  
CGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGA  
GGGTCAATTGGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTC  
CACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA  
GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA  
GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACT  
CCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGG  
GCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAA  
CCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCC  
TTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGT  
GAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATTTTAGTTGC  
CAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGCAAGCCGGAGGAA  
GGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC  
GTGCTACAAATGGATGGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAA  
TCCCATAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT  
GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGT  
TCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCACGAGA

Lm48

TAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCATGCCACGCTTTTGAAAGATG  
GTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTA  
GGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGAT  
CGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGT  
ATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGAACAAGG  
ATAAGAGTAACTGCTTGTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTGATGTGA  
AAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGAAAGACTGGAGT  
GCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
GTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCT

|      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | GAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA<br>CGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCTTAGTGC<br>TGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG<br>AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTT<br>TAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACC<br>ACTC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Lm49 | -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Lm50 | CAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCC<br>GCGTGATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACTGTTGTTAGAGAAGA<br>ACAAGGATAAGAGTAACGCTTGCTCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGC<br>CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT<br>TGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTTAAGTCTG<br>ATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAGAC<br>TGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT<br>AGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC<br>GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT<br>AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCCT<br>TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCA<br>AGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCAT<br>GTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCT<br>TTGACCACTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTG<br>GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGC<br>AACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTA<br>AAGTGACTGCCGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT<br>CATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATAGTACAAA<br>GGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACTATTCTCAGTT<br>CGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATC<br>GTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC<br>CCGTACACCACGAGAG                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Lm51 | GTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGTTGG<br>GGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATGATAAAGTGTGGCGCA<br>TGCCACGCTTTTGAAAGATGGTTTCGGCTATCGCTTACAGATGGGCCCCG<br>GGTGCAATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATGCAT<br>AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG<br>ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCT<br>GACGGAGCAACGCCGCGTGTATGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGTACT<br>GTTGTTAGAGAAGAACAAGGATAAGAGTAAGTCTTGCTCCCTTGACGGTA<br>TCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG<br>TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCG<br>GTCTTTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTCATT<br>GGAAACTGGAAGACTGGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTA<br>GCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTC<br>TCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA<br>TTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG<br>GGGTTTCCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGG<br>GGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGAC<br>AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCA<br>GGTCTTGACATCCTTTGACCCTCTGGAGACAGAGCTTTCCCTTCGGGGA<br>CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTT<br>GGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGATTTTAGTTGCCAGCATTT<br>AGTTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGTGCAAGCCGGAGGAAGGTGGGGA<br>TGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA<br>ATGGATAGTACAAAGGGTCGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAA<br>AACTATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGG<br>AATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGC<br>CTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAG |

Lm52

AACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGC  
ATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTG  
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAGCC  
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACC  
GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTG  
TTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACGTAACGTCCCCTGACGGTATCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGG  
TGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT  
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAA  
ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGG  
TGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG  
GTCTGTAACGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG  
ATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGT  
TTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG  
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTC  
TTGACATCCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAA  
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGT  
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTT  
GGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGA  
CGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATG  
GGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGC  
TTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGG

## Anexo II

Identificação dos isolados bacterianos  
identificados por sequenciação do gene  
16S rRNA

| Isolado | E-value | Accession<br>Number | Identities       | Estirpe                          | Comprimento           |
|---------|---------|---------------------|------------------|----------------------------------|-----------------------|
|         |         |                     |                  |                                  | sequência<br>16S (pb) |
| Lm1a    | 0       | KY940340            | 1312/1312 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm1b    | 0       | KX527650            | 1239/1239 (100%) | <i>Cellulosimicrobium sp.</i>    | 1349                  |
| Lm2     | 0       | KY940340            | 1318/1318 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm3     | 0       | KX299051            | 1360/1364 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1401                  |
| Lm4a    | 0       | KY940340            | 1297/1297 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm4b    | 0       | NR_112628           | 1203/1203 (100%) | <i>Lysinibacillus fusiformis</i> | 1477                  |
| Lm5     | 0       | NR_116805           | 1316/1316 (100%) | <i>L. innocua</i>                | 1501                  |
|         | 0       | KX299051            | 1316/1316 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1401                  |
| Lm6     | 0       | KY940340            | 1272/1276 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm7     | 0       | KY940340            | 1315/1315 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm8     | 0       | KY940340            | 1284/1284 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm9     | 0       | KY940340            | 1296/1296 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm10    | 0       | KY940340            | 1296/1296 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm11    | 0       | KY940340            | 1268/1268 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm12    | 0       | KY940340            | 1308/1308 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm13    | 0       | FJ774237            | 1307/1308 (99%)  | <i>L. innocua</i>                | 1501                  |
|         | 0       | KX299052            | 1303/1308 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1401                  |
| Lm14    | 0       | KY952657            | 675/676 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>          | 1291                  |
| Lm15    | 0       | KY940340            | 1295/1295 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm16    | 0       | CP011345            | 1252/1262 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1559                  |
| Lm17    | 0       | FJ774237            | 1322/1329 (99%)  | <i>L. innocua</i>                | 1501                  |
|         | 0       | KX299052            | 1318/1329 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1401                  |
| Lm18    | 0       | KY940340            | 1331/1332 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm19    | 0       | KY940340            | 1300/1300 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm20    | 0       | KY940340            | 1263/1263 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm21    | 0       | KY940340            | 1283/1283 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |
| Lm22    | 0       | KY940340            | 1331/1331 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>          | 1456                  |

|                |                        |           |                  |                               |      |
|----------------|------------------------|-----------|------------------|-------------------------------|------|
| <b>Lm23</b>    | 0                      | KY940340  | 1261/1261 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm24</b>    | 0                      | KY940340  | 1290/1290 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm25</b>    | 0                      | KY940340  | 1327/1327 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm26</b>    | 0                      | KY940340  | 1313/1313 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm27</b>    | 0                      | KY940340  | 1355/13156 (99%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm28</b>    | 0                      | KY940340  | 1310/1311 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm29</b>    | 0                      | KY952657  | 431/435 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm30a/b</b> | 0                      | LC2103017 | 1277/1278 (99%)  | <i>Enterococcus faecalis</i>  | 1524 |
| <b>Lm31</b>    | 0                      | NR_116805 | 904/905 (99%)    | <i>L. innocua</i>             | 1501 |
|                | 0                      | KF571470  | 904/905 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1428 |
| <b>Lm32</b>    | 0                      | KY952657  | 317/317 (100%)   | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm33</b>    | 0                      | KY952657  | 938/940 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm34</b>    | 0                      | KY952657  | 958/961 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm35</b>    | 0                      | KY952657  | 840/843 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm36</b>    | 0                      | KY952657  | 927/932 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm37</b>    | 0                      | KY940340  | 1313/1313 (100%) | <i>L. monocytogenes</i>       | 1456 |
| <b>Lm38</b>    | 0                      | KY952657  | 965/970 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm39</b>    | 0                      | KX299043  | 939/940 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1400 |
| <b>Lm40</b>    | 0                      | LC186053  | 840/841 (99%)    | <i>Cellulosimicrobium sp.</i> | 1515 |
| <b>Lm41</b>    | 0                      | KY952657  | 903/904 (99%)    | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm42</b>    | 0                      | KY952657  | 969/969 (100%)   | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm43</b>    | 0                      | KY952657  | 791/791 (100%)   | <i>L. monocytogenes</i>       | 1291 |
| <b>Lm44a</b>   | 0                      | NR_116805 | 1294/1296 (99%)  | <i>L. Innocua</i>             | 1501 |
|                | 0                      | KX299051  | 1294/1296 (99%)  | <i>L. monocytogenes</i>       | 1401 |
| <b>Lm44b</b>   | 0                      | KF709388  | 819/839 (97%)    | <i>Enterococcus faecalis</i>  | 1056 |
| <b>Lm45</b>    | 6.19x10 <sup>-98</sup> | S55473    | 203/203 (100%)   | <i>L. innocua</i>             | 1518 |
|                | 6.19x10 <sup>-98</sup> | KX299051  | 203/203 (100%)   | <i>L. monocytogenes</i>       | 1401 |
| <b>Lm46</b>    | 0                      | NR_116805 | 1217/1239 (98%)  | <i>L. Innocua</i>             | 1501 |
|                | 0                      | KX299051  | 1217/1239 (98%)  | <i>L. monocytogenes</i>       | 1401 |
| <b>Lm47</b>    | 0                      | NR_116805 | 1281/1288 (98%)  | <i>L. Innocua</i>             | 1501 |
|                | 0                      | KX299051  | 1268/1288 (98%)  | <i>L. monocytogenes</i>       | 1401 |

|             |   |                                                        |                 |                              |      |
|-------------|---|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------|------|
| <b>Lm48</b> | 0 | KY952657                                               | 900/904 (99%)   | <i>L. monocytogenes</i>      | 1291 |
| <b>Lm49</b> | 0 | Não conclusivo devido ao reduzido tamanho da sequência |                 |                              |      |
| <b>Lm50</b> | 0 | KY940340                                               | 1063/1067 (99%) | <i>L. monocytogenes</i>      | 1456 |
| <b>Lm51</b> | 0 | KY940340                                               | 1326/1331 (99%) | <i>L. monocytogenes</i>      | 1456 |
| <b>Lm52</b> | 0 | LC213628                                               | 1207/1215 (99%) | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1471 |