



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia

2014

**Vânia Patrícia Franco  
de Araújo**

**O efeito do stresse frio na virulência de *Listeria  
monocytogenes***

## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Universidade de  
Aveiro**

**2013/2014**

Departamento de Biologia

**Vânia Patrícia Franco  
de Araújo**

**O efeito do stresse frio na virulência de *Listeria  
monocytogenes***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar com agregação do Departamento dos Recursos Naturais Ambiente e Território do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa e co-orientação científica da Professora Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha, Professora Auxiliar, do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Trabalho realizado, na íntegra, no Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, Departamento dos Recursos Naturais Ambiente e Território, Laboratório de Microbiologia

## **o júri**

presidente

**Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso**  
professora auxiliar com agregação da Universidade de Aveiro

vogais

**Doutora Isabel da Silva Henriques**  
investigadora auxiliar da Universidade de Aveiro – Centro de Estudos do Ambiente e do Mar  
(CESAM)

**Professora Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito**  
professora auxiliar com agregação da Universidade de Lisboa - Instituto Superior de Agronomia

## agradecimentos

Existem trabalhos individuais que seriam impossíveis de realizar sozinho. Este foi um deles. Desde que iniciei o mestrado, muitos foram os que depositaram em mim uma enorme confiança e carinho que, por muitas vezes, foram as únicas coisas que me permitiram seguir em frente. Sem todo esse apoio este trabalho não teria sido possível.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, um sincero MUITO OBRIGADO. Não só por me ter acolhido no seu laboratório, mas por muitas outras razões. É difícil colocar em palavras toda a minha gratidão.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Ângela Cunha, por toda a disponibilidade que sempre demonstrou, desde o primeiro dia. Os meus agradecimentos.

Ao professor Pedro Louro por toda a ajuda que me deu na parte da análise estatística.

À Mestre Ana Carla Silva por todo o companheirismo, pela preciosa ajuda no trabalho prático, pela companhia para as provas no PAI, por todas as conversas e risadas e, principalmente, pela amizade.

Ao resto do pessoal do laboratório: à Ana Rita, à Filipa, à Barbara, ao António, à Paulinha e ao Mahesh por toda a companhia, conversas e apoio.

Aos meus amigos, a todos eles, por fazerem parte da minha vida. Por me fazerem não pensar só em trabalho e por me fazerem sair de casa para me divertir.

À Vanessa, por ser igual a mim, por não me deixar sentir “burra” sozinha, por todas as crises existenciais conjuntas, por todos os momentos de chorar a rir, por me carregar para casa e por me acompanhar SEMPRE.

Ao meu namorado, João Pechincha, por todo o carinho, amor e companheirismo e também pela paciência, que é mais que muita. Que seja para toda a vida.

À minha família por acreditarem em mim e no meu potencial e por estarem presentes sempre que preciso. A família é o bem mais precioso que temos na vida

Aos meus pais, as pessoas que fizeram de mim o que sou hoje. Por todo o amor, carinho e educação. Por estarem sempre lá para me amparar a queda. Agradeço por todas as oportunidades que me deram e ainda me dão na vida, sem eles nada disto teria sido possível.

## palavras-chave

*Listeria monocytogenes*; virulência; viabilidade; temperatura de refrigeração; *Plaque forming assay* (PFA), stresse nutritivo

## resumo

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria patogénica de origem alimentar capaz de sobreviver e de crescer a temperaturas de refrigeração. O principal objetivo deste trabalho foi investigar, na ausência de nutrientes, o possível efeito do stresse térmico (7 °C) e do respetivo tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na virulência de *L. monocytogenes*, usando como termo de comparação a exposição das bactérias a 37 °C. Simultaneamente foi também avaliada a viabilidade bacteriana nas mesmas condições.

De modo a avaliar o potencial virulento de *L. monocytogenes*, utilizou-se o protocolo de formação de placas de lise (PFA), através da infeção da linha celular humana HT-29 pelas estirpes bacterianas, imediatamente após exposição às condições em estudo. O potencial virulento das estirpes foi expresso como a média dos logaritmos decimais do número de placas formadas (log PFA) e a sua viabilidade expressa como a média dos logaritmos do número de bactérias viáveis (log UFC/ml). Os resultados foram sujeitos a uma ANOVA utilizando o teste de comparação múltipla *post hoc* LSD.

Ao longo do tempo de exposição, a 7 °C, verificou-se, em todos os isolados, uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da virulência. A 37 °C também se verificou uma diminuição significativa em 9 dos 10 isolados em estudo. Em geral, o número de bactérias viáveis à temperatura de refrigeração manteve-se constante, enquanto que a 37 °C se verificou uma diminuição significativa no número de bactérias viáveis.

Ao contrário da temperatura e da interação tempo×temperatura, cujo nível de significância dependia da estirpe, o tempo de exposição foi sempre altamente significativo ( $p < 0,01$ ) na redução da virulência inicial das estirpes. Relativamente à viabilidade celular, quer o tempo, quer a temperatura, bem como a interação tempo×temperatura foram sempre altamente significativos ( $p < 0,01$ ) na perda de viabilidade.

Os resultados apresentados neste trabalho sugerem que, tanto a exposição das bactérias às temperaturas de refrigeração, como o tempo de exposição em condições de ausência de crescimento, poderão resultar numa redução significativa da virulência inicial dos isolados. Realça-se assim o fato de que os alimentos que sustentam o crescimento deste patógeno devem constituir o principal objetivo da gestão de risco associado à presença desta bactéria patogénica nos alimentos.

**keywords**

*Listeria monocytogenes*; virulence; viability; refrigeration temperature; Plaque forming assay (PFA), nutritive stress

**abstract**

*Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogenic bacteria that can survive and even grow at refrigeration temperatures, making RTE foods an important source of infection.

The main objective of this study was to investigate, in the absence of nutrients, the possible role of refrigeration temperature (7 ° C) and the respective exposure time (0, 1 and 7 days), on the virulence of *L. monocytogenes*, using the exposure to 37 ° C as term of comparison. Simultaneously, the bacterial viability, under the same conditions was also accessed.

In order to evaluate the virulence of *L. monocytogenes*, the plaque forming assay (PFA) protocol was performed in the infection of human cell line HT-29, with the bacterial strains in study. The virulence of the strains was expressed as the average of the logarithms of the number of plaques formed (log PFA) and their viability expressed as the mean of the logarithms of the number of viable bacteria (log CFU/mL). The results were subjected to ANOVA using the LSD multiple comparison post hoc test.

Unlike the temperature and the temperature×time interaction, which significance level was strain dependent, the exposure time was highly significant ( $p < 0,01$ ) in reducing the initial virulence of the strains. For the cell viability, time, temperature, as well as temperature×time interaction were always highly significant ( $p < 0,01$ ) in the loss of viability.

The results of this study suggest that both exposing the bacteria to refrigeration temperatures, as the time of exposure in the absence of growth, may result in a significant reduction of the initial virulence of the isolates. Thus, foods that support the growth of this pathogen should remain the main objective of risk management associated with the presence of this pathogenic bacteria in food.

# Índice

<b>Índice .....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xii</b>
<b>Índice de Tabelas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>Lista de abreviaturas.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.2. Listeriose.....	3
1.3. Patogénese .....	5
1.4. Ciclo infeccioso e principais fatores de virulência .....	6
1.4.1. PrfA.....	7
1.4.2. Listeriolisina O.....	8
1.4.3. Internalinas .....	8
1.4.4. Fosfolipases.....	9
1.4.5. ActA.....	10
1.4.6. p60 .....	10
1.4.7. VirR.....	11
1.5. Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> a baixas temperaturas .....	11
1.5.1. Alterações na composição da membrana .....	11
1.5.2. Alterações na expressão de genes e indução de proteínas.....	12
1.5.3. Solutos compatíveis como crioprotetores.....	12
1.5.4. Papel do fator alternativo sigma B ( $\sigma^B$ ).....	12
1.6. Efeito de temperaturas de refrigeração na virulência de <i>L. monocytogenes</i> .....	13
1.7. Avaliação, <i>in vitro</i> , do potencial virulento em <i>L. monocytogenes</i> .....	14





1.8. Enquadramento do trabalho e objetivos	15
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>17</b>
2.1. Estirpes bacterianas e linhagem celular	17
2.2. Meios de cultura	18
2.2.1. TSB e TSA-YE	18
2.2.2. RPMI 1640	18
2.2.3. D-MEM	19
2.3. Soluções utilizadas nos ensaios de PFA e na manutenção da linha celular	19
2.3.1. Tripsina-Versène (ATV)	19
2.3.2. Soro bovino fetal (SBF)	20
2.3.3. Soro fisiológico tamponado	20
2.3.4. Tampão fosfato-salino ( <i>Phosphate Buffered Saline – PBS</i> )	21
2.3.5. Solução mistura de penicilina e estreptomicina	21
2.3.6. Solução de gentamicina	21
2.3.7. Solução de L-glutamina	22
2.3.8. Solução corante de azul de tripano	22
2.4. Preparação das suspensões bacterianas	22
2.5. Manutenção da linha celular animal	24
2.6. Ensaio de formação de placas ( <i>Plaque Forming Assay – PFA</i> )	25
2.6.1. Infecção do tapete celular	26
2.6.2. Eliminação das bactérias extracelulares	26
2.6.3. Deposição da agarose	26
2.6.4. Contagem das placas de lise	27
2.6.5. Expressão e análise estatística dos resultados	27
<b>3. Resultados e discussão</b>	<b>28</b>
3.1. Efeito do tempo e da temperatura na virulência de <i>L. monocytogenes</i>	28



3.2. Efeito do tempo e da temperatura na viabilidade de <i>L. monocytogenes</i> .....	34
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>40</b>
<b>5. Bibliografia .....</b>	<b>42</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Fases do ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i> . .....	6
<b>Figura 2</b> - Estrutura da região cromossomal LIPI-1. ....	7
<b>Figura 3</b> - Diagrama do processo de mobilidade baseada na actina e disseminação célula a célula de <i>L. monocytogenes</i> . ....	10
<b>Figura 4</b> - Curva de calibração para a estirpe de referência CBISA 3001 em soro fisiológico tamponado. ....	23
<b>Figura 5</b> - Cultura de células da linhagem HT-29 com densidade baixa e elevada. ....	24
<b>Figura 6</b> - Valores médios de virulência (log PFA) de cada uma das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com a temperatura (7 °C e 37 °C) e o tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na ausência de nutrientes. ....	31
<b>Figura 7</b> - Valores médios de viabilidade (log UFC/mL) de cada uma das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> de acordo com a temperatura (7 °C e 37 °C) e o tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na ausência de nutrientes. ....	36



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Linhagens de <i>L.monocytogenes</i> .....	3
<b>Tabela 2</b> - Isolados utilizados neste estudo e respectivas origens .....	17
<b>Tabela 3</b> - Composição da solução de Tripsina-Versène .....	20
<b>Tabela 4</b> - Composição da solução tampão fosfato-salino .....	21
<b>Tabela 5</b> - Efeitos dos fatores tempo e temperatura na virulência e viabilidade de cada uma das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> estudadas .....	29
<b>Tabela 6</b> - Efeito do tempo de exposição às temperaturas de 7 °C e 37 °C na virulência (log PFA) de 10 isolados de <i>L. monocytogenes</i> , em condições de stresse nutritivo. ....	30
<b>Tabela 7</b> - Efeito do tempo de exposição às temperaturas de 7 °C e 37 °C na viabilidade (log UFC/mL) de 10 isolados de <i>L. monocytogenes</i> em condições de stresse nutritivo .....	35





## Lista de abreviaturas

<b>A</b>	Absorvância
<b>ATV</b>	Tripsina-Versène
<b>Caps</b>	<i>Cold-Acclimation Proteins</i>
<b>CBISA</b>	Coleção de Bactérias do Instituto Superior de Agronomia
<b>CECT</b>	<i>Colección Española de Cultivos Tipo</i>
<b>CSPs</b>	<i>Cold Shock Proteins</i>
<b>D-MEM</b>	<i>Dulbecco's Minimal Essential Medium</i>
<b>ECACC</b>	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
<b>HGF</b>	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
<b>Inl A</b>	Internalina A
<b>Inl B</b>	Internalina B
<b>LIPI-1</b>	<i>Listeria Pathogenicity Island 1</i>
<b>LLO</b>	Listeriolisina O
<b>LRRs</b>	<i>Leucin-Rich-Repeats</i>
<b>LSD</b>	<i>Least Significant means</i>
<b>LTS</b>	<i>Long-Term Survival</i>
<b>MR</b>	<i>Metilo Red</i>
<b>PAIs</b>	<i>Pathogenicity Islands</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>PFA</b>	<i>Plaque Forming Assay</i>
<b>PLC</b>	<i>Phospholipase C</i>
<b>PrfA</b>	<i>Positive Regulatory Factor A</i>
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RTE</b>	<i>Ready-To-Eat</i>
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>TSA-YE</b>	<i>Tryptic Soy Agar-Yeast Extract</i>
<b>TSB-YE</b>	<i>Tryptic Soy Broth-Yeast Extract</i>
<b>VP</b>	<i>Voges - Proskauer</i>
<b><math>\sigma^B</math>/SigB</b>	Sigma B

# 1. Introdução

## 1.1. *Listeria monocytogenes*

O género *Listeria* (*L.*) compreende, atualmente, 15 espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia* e *L. grandensis*, tendo sido as últimas cinco descritas apenas em 2014 (Liu, 2006; Goldfine & Shen, 2007; Graves *et al.*, 2010; Leclercq *et al.*, 2010; Bertsch *et al.*, 2013; Lang Haltere *et al.*, 2013; den Bakker *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são as únicas patogénicas sendo a primeira patogénica para alguns mamíferos, incluindo o Homem, e *L. ivanovii* apenas para animais (Goldfine & Shen, 2007; Guillet *et al.*, 2010). Existem no entanto evidências de infeções humanas ocasionais causadas pela espécie *L. ivanovii* (Cummins *et al.*, 1994; Lessing *et al.*, 1994; Guillet *et al.*, 2010). Todas as restantes espécies pertencentes a este género são, habitualmente, saprófitas inofensivas (Goldfine & Shen, 2007).

A espécie *L. monocytogenes* é oportunista e ubíqua no ambiente sendo comumente encontrada em vários tipos de ambientes tais como solo, plantas, água, efluentes, uma grande variedade de alimentos e ainda em fezes de seres humanos e de animais (Farber & Peterkin, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Liu, 2006).

*L. monocytogenes* é um bacilo Gram positivo, com baixo conteúdo em G+C, não capsulado, anaeróbio facultativo, não formador de esporos, que consegue crescer numa gama vasta de temperaturas que vai de -0,4 a 50 °C (Farber & Peterkin, 1991) e que sobrevive a temperaturas tão baixas como as de congelação (Ramaswamy *et al.*, 2007). É uma bactéria relativamente tolerante ao cloreto de sódio (consegue crescer em ambientes com concentrações salinas até 10%) e que consegue crescer a valores de pH de 4,5 a 9 (Sleator *et al.*, 2003; Ryser & Marth, 2007; Vera *et al.*, 2013). *L. monocytogenes* possui flagelos à temperatura ambiente, mas perde a mobilidade a 37 °C (Gyles, 2010).

*L. monocytogenes* forma pequenas colónias translúcidas com dimensões entre 0,2 a 1,5 mm de diâmetro, 24-48 horas após incubação aeróbica a 37 °C, em meio bacteriológico comum (Gyles, 2010).

Este patógeno é um microrganismo catalase positivo, oxidase negativo e H<sub>2</sub>S negativo, expressa uma β-hemolisina (Farber & Peterkin, 1991; Goldfine & Shen, 2007) e produz resultados positivos nos testes de vermelho de metilo (MR) e Voges – Proskauer (VP) (Ryser & Marth, 2007).

Esta espécie é dividida em subgrupos de acordo com os seus traços genotípicos e fenotípicos. A combinação de proteínas de superfície somáticas (O) e flagelares (H) nesta bactéria permite dividi-la em 13 serótipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e e 7. Maioritariamente, os casos de listeriose são provocados pelos serótipos 4b, 1/2b e 1/2a (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Liu, 2006; Goldfine & Shen, 2007).

Vários estudos de serotipagem sugerem que *L. monocytogenes* seja dividida em quatro linhagens evolutivas distintas (Tran & Kathariou, 2002; Orsi *et al.*, 2011). A linhagem I engloba estirpes com os serótipos 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e e 7. Estirpes com serótipos 1/2a, 1/2c, 3c, 3a pertencem à linhagem II e, finalmente, estirpes com os serótipos 4a e 4c, e alguns isolados de serótipo 4b, são agrupadas na linhagem III e IV (Liu *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008; Gyles, 2010). A tabela 1 representa, sumariamente, as linhagens de *L. monocytogenes*. Maioritariamente, os casos de listeriose humana estão relacionados com as linhagens I e II, sendo que estirpes da linhagem I parecem ter um maior potencial patogénico para humanos (revisto por Orsi *et al.*, 2011).

**Tabela 1 - Linhagens de *L.monocytogenes***

<b>Linhagem</b>	<b>Identificação inicial</b>	<b>Serótipos</b>	<b>Características genéticas</b>	<b>Distribuição</b>
<b>I</b>	Piffaretti <i>et al.</i> (1989)	1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e 7	Menor diversidade entre as linhagens; níveis mais baixos de recombinação entre as linhagens	Comumente isoladas de diversas fontes; sobre-representados entre os isolados humanos
<b>II</b>	Piffaretti <i>et al.</i> (1989)	1/2a, 1/2c, 3c, 3a	Maior diversidade, níveis mais altos de recombinação	Comumente isoladas de diversas fontes; sobre-representados em alimentos e produtos relacionados com alimentos, bem como ambientes naturais
<b>III</b>	Rasmussen <i>et al.</i> (1995)	4a, 4b, 4c	Muita diversidade.	Maioria dos isolados derivados de ruminantes
<b>IV</b>	Descrita pela primeira vez como IIIB por: Roberts <i>et al.</i> (2006); Descrita pela primeira vez como IV por Abram <i>et al.</i> (2008)	4a, 4b, 4c	Poucos isolados analisados até ao momento.	Maioria dos isolados derivados de ruminantes

Adaptado de: Orsi *et al.* (2011)

## 1.2. Listeriose

A listeriose é uma doença de origem alimentar causada por *L. monocytogenes* (Disson & Lecuit, 2013). A principal via de transmissão, tanto para humanos como para animais, é o consumo de alimentos contaminados. No entanto, apesar de rara, a transmissão também pode ocorrer de animais para humanos e mesmo entre humanos (Farber & Peterkin, 1991).

Como referido anteriormente, casos de listeriose humana são principalmente provocados por estirpes dos serótipos 1/2a, 1/2b e 4b. Estirpes do serótipo 4b são responsáveis pela maior parte dos casos de listeriose (64%), sendo estirpes do tipo 1/2a e 1/2b responsáveis por 15% e 10% dos casos, respetivamente. O serótipo 1/2c também é

responsável por alguns casos de listeriose, representando apenas 4% dos mesmos no Reino Unido (McLauchlin, 1990).

Este patógeno é comumente encontrado no solo e água podendo facilmente contaminar alimentos de origem animal tais como carnes e laticínios. *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver e crescer a temperaturas de refrigeração, em alimentos embalados a vácuo e em atmosfera modificada o que torna os alimentos prontos-a-comer (*Ready-To-Eat* - RTE) e com vida útil longa (uma ou mais semanas) uma importante fonte de infecção. Caso o processamento do alimento não inclua uma etapa de tratamento térmico, *L. monocytogenes* pode permanecer no produto RTE acabado (Lambertz *et al.*, 2012). Os critérios para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos estão especificados no Regulamento (CE) Nº 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, e sucessivas alterações, referente a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios: para alimentos prontos para consumo destinados a lactentes e alimentos prontos para consumo destinados a fins medicinais específicos é requerida ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento. Alimentos prontos para consumo suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos é também requerida ausência em 25 g de alimento, antes de o alimento deixar de estar sob o controlo imediato do operador da empresa do sector alimentar que o produziu e o limite de detecção é 100 UFC/g durante o período de vida útil do alimento. Finalmente, para alimentos prontos para consumo não suscetíveis de permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, exceto os destinados a lactentes e a fins medicinais específicos o limite de detecção é de 100 UFC/g durante o período de vida útil do alimento (Reg. CE Nº 2073/2005).

Casos graves de listeriose em humanos são raros e ocorrem principalmente em fetos, em recém-nascidos, idosos e pessoas com o sistema imunitário enfraquecido (Hof *et al.*, 1992). Apesar de pouco frequentes, as infecções humanas por *L. monocytogenes* são muito importantes devido à elevada taxa de mortalidade associada à listeriose, que pode exceder os 30%. Estes organismos encontram-se entre as mais importantes causas de morte devido a infecções alimentares em países industrializados (Ramaswamy *et al.*, 2007). A listeriose tem

umas das mais altas taxas de hospitalização (91%) entre doenças alimentares conhecidas, com sequelas adicionais, a longo prazo, em alguns pacientes (Denny & McLauchlin, 2008). Os principais sintomas desta patologia são febre, fadiga e dores nas articulações, o que leva a que muitas vezes a listeriose seja confundida com uma gripe comum. No entanto, quando a infecção se estende para além do trato gastrointestinal, a listeriose pode levar a complicações severas tais como meningite, septicemia, encefalite, morte fetal entre outras (Goldfine & Shen, 2007; Al-Zeyara *et al.*, 2011).

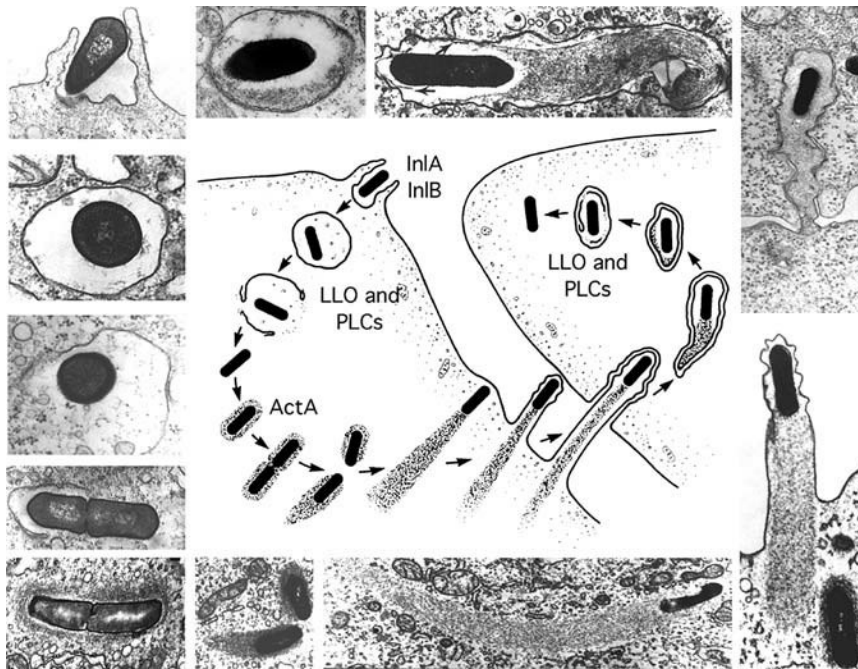
### 1.3. Patogénese

A listeriose pode ocorrer, maioritariamente, em duas variantes: ou como doença gastrointestinal ligeira, ou como doença invasiva grave com uma elevada taxa de mortalidade associada (20-30%) (Farber & Peterkin, 1991). A evolução clínica de uma infecção por *L. monocytogenes* depende de vários fatores, tais como o número de bactérias ingeridas, o potencial virulento da bactéria, uma vez que este varia consoante a estirpe, e ainda o estado imunológico do hospedeiro (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Para indivíduos saudáveis, estima-se que a dose infecciosa necessária para causar patologia seja elevada, cerca de  $10^6$  UFC, e os sintomas, que ocorrem normalmente entre 18 a 20 horas após a ingestão, são tipicamente de gastroenterite incluindo diarreia, vômitos e febre. A variante gastrointestinal de listeriose é autolimitada e resolve-se, habitualmente, de forma espontânea sem danos permanentes (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Lecuit, 2007).

No caso da listeriose invasiva grave, o trato intestinal é a principal via de entrada (Vazquez-Boland *et al.*, 2001) e, após atravessar a barreira intestinal, a bactéria é disseminada no sangue atingindo os órgãos primários alvo, fígado e baço, onde normalmente é eliminada pelos macrófagos. Uma vez que em indivíduos imunocomprometidos não há uma resposta imunitária apropriada, a infecção pode resultar num crescimento sem restrições de *L. monocytogenes* e na sua posterior libertação para a corrente sanguínea e colonização de órgãos secundários como o cérebro ou a placenta, conduzindo a estados clínicos mais severos (Goldfine & Shen, 2007; Ramaswamy *et al.*, 2007; Camejo *et al.*, 2011).

#### 1.4. Ciclo infeccioso e principais fatores de virulência

Estão identificados vários fatores de virulência que permitem a esta bactéria funcionar como um organismo intracelular. *L. monocytogenes* produz uma proteína de superfície, denominada de internalina, que interage com recetores dos macrófagos e células que revestem o intestino induzindo a sua própria fagocitose. Outro fator de virulência, listeriolisina O, permite a este patogénio escapar ao fagossoma. Uma vez livre no citoplasma, a bactéria pode dividir-se e induzir a polimerização de actina da célula hospedeira, de modo a alcançar a membrana celular e infetar células vizinhas. Através deste mecanismo, *L. monocytogenes* consegue evitar anticorpos, o sistema do complemento e neutrófilos (Portnoy *et al.*, 2002; Goldfine & Shen, 2007). Este processo encontra-se representado na Figura 1.



**Figura 1 - Fases do ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.**  
Adaptado de: Portnoy *et al.* (2002)



Como em outros agentes patogênicos bacterianos, os genes de virulência de *Listeria* estão organizados em ilhas de patogenicidade (*Pathogenicity Islands*- PAIs). Uma dessas ilhas, LIPI-1 (*Listeria pathogenicity Island 1*), desempenha um papel central na patogênese de *Listeria*, uma vez que apresenta seis genes de virulência essenciais para o parasitismo intracelular da bactéria, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

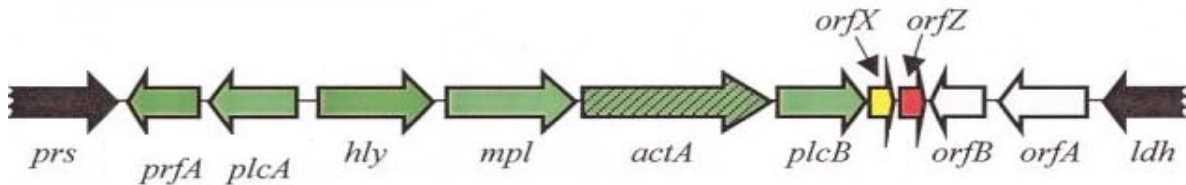


Figura 2 - Estrutura da região cromossomal LIPI-1. Os genes pertencentes a LIPI-1 estão representados a verde. O gene mais divergente está representado a verde claro (*actA*)

Adaptado de: Vazquez-Boland *et al.* (2001)

#### 1.4.1. PrfA

O fator regulador positivo A (*Positive regulatory factor A* – PrfA) é uma proteína de 27 kDa, codificada pelo gene *prfA*, que está envolvida no controle da expressão de muitos dos genes de virulência presentes em *L. monocytogenes* (Vera *et al.*, 2013). Esta proteína regula o próprio gene *prfA* e outros como *hly* que codifica para proteína LLO (listeriolisina O). PrfA regula também a ativação transcricional da LIPI-1 (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Além das funções regulatórias acima descritas, PrfA regula ainda, negativamente, alguns genes de *L. monocytogenes* como *clpP*, um gene mediador da resposta ao stresse, e os genes associados à mobilidade, *motA* e *flaA* (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Esta proteína responde a sinais ambientais e endógenos e permite uma adaptação flexível e sensível a mudanças de condições e uma rápida alternância de estado avirulento para o estado virulento (de las Heras *et al.*, 2011; Vera *et al.*, 2013).

#### 1.4.2. Listeriolisina O

O fator hemolítico listeriolisina O (LLO), uma proteína de 58 kDa codificada pelo gene *hly*, foi o primeiro fator de virulência a ser identificado em *L. monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1986) e é considerado um dos principais fatores ligados à virulência, uma vez que nenhuma estirpe não hemolítica exibe patogenicidade e as que têm atividade hemolítica fraca são menos virulentas do que as estirpes selvagens hemolíticas (Farber & Peterkin, 1991). Esta proteína é necessária para a evasão de *L. monocytogenes* do fagossoma da célula hospedeira (Goldfine & Shen, 2007). O mecanismo preciso de evasão do fagossoma permanece desconhecido, mas existem evidências que LLO tem dois papéis principais: o de se inserir no fagossoma, impedindo que este complete a sua maturação no macrófago (Cheng *et al.*, 2005; Henry *et al.*, 2006; Shaughnessy *et al.*, 2006) e o de funcionar como poro translocacional para as fosfolipases C (PLC) o que pode resultar em lise vacuolar (Wadsworth & Goldfine, 2002). A saída eficiente da bactéria do vacúolo de membrana dupla tem um papel fundamental na infecção célula a célula (Gedde *et al.*, 2000).

#### 1.4.3. Internalinas

As Internalinas pertencem a uma família de proteínas caracterizadas pela presença de regiões amino-terminal com repetições em tandem ricas em leucina (*Leucin-Rich Repeats* – LRRs).

A internalina A (InIA) é uma proteína de 800 aminoácidos cujo domínio carboxilo-terminal exibe um padrão de domínio LPTTG que é reconhecido na ligação covalente da proteína à parede celular bacteriana. Esta internalina interage com a molécula de aderência E-caderina, das células epiteliais polarizadas, através das LRRs, facilitando assim a penetração de *L. monocytogenes* nas células do hospedeiro (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006; Goldfine & Shen, 2007).

A internalina B (InIB) é uma proteína de 630 aminoácidos codificada pelo mesmo operão que a InIA (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Esta proteína não está ligada

covalentemente à parede celular bacteriana, mas sim fracamente ligada aos ácidos lipoteicóicos através de uma série de módulos, os domínios GW (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006; Goldfine & Shen, 2007). O principal recetor de sinalização desta proteína é o recetor do fator de crescimento dos hepatócitos (*Hepatocyte Growth Factor* – HGF) também conhecido como Met (Shen *et al.*, 2000). Esta proteína está diretamente ligada à invasão dos hepatócitos.

#### 1.4.4. Fosfolipases

As espécies do género *Listeria* produzem três enzimas com atividade de fosfolipase C (PLC) que estão relacionadas com a virulência. A espécie *L. monocytogenes* apenas produz duas destas enzimas: PI-PLC, codificada pelo gene *plcA*, e PC-PLC, codificada pelo gene *plcB* (Smith *et al.*, 1995; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). PI-PLC é uma proteína de 33 kDa que promove a evasão do fagossoma enquanto PC-PLC, proteína de 29 kDa, é necessária para a invasão de *L. monocytogenes* célula a célula (Smith *et al.*, 1995; Goldfine *et al.*, 1998).

A rotura da membrana do fagossoma é reforçada por estas duas fosfolipases. Estas enzimas cooperam com LLO na lise do vacúolo primário. PC-PLC é expressa como precursor inativo cuja ativação ocorre no ambiente vacuolar ácido e é mediada pela metaloprotease Mpl (Camejo *et al.*, 2011).

### 1.4.5. ActA

ActA é uma proteína de superfície codificada pelo gene *actA* que desempenha um papel importante na disseminação bacteriana nos tecidos do hospedeiro sem passar pelo ambiente extracelular (Goldfine & Shen, 2007). ActA, no seu domínio C-terminal, tem uma região de cauda hidrofóbica transmembranar que retém a proteína na membrana citoplasmática bacteriana. Esta proteína é responsável pela polimerização dos filamentos de actina num pólo,

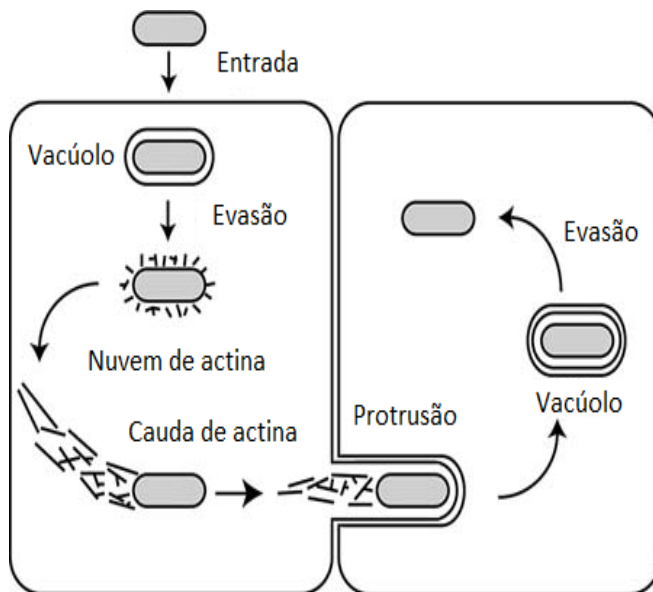


Figura 3 - Diagrama do processo de mobilidade baseada na actina e disseminação célula a célula de *L. monocytogenes*.

A internalização das bactérias no vacúolo é seguida por evasão no citoplasma. Pouco tempo após a fuga, as bactérias são cercadas por nuvens de filamentos de actina. Posteriormente, as nuvens de filamentos de actina são convertidas em caudas de actina e as bactérias iniciam o movimento. O movimento impulsiona as bactérias contra a membrana plasmática causando a formação de uma protrusão que pode ser engolida pela célula vizinha onde o ciclo se repete.

Adaptado de: Goldfine & Shen (2007)

formando uma estrutura semelhante à cauda de um cometa que permite a propulsão bacteriana e o movimento no citoplasma da célula hospedeira. Este mecanismo que permite a invasão célula a célula (Camejo *et al.*, 2011) está representado na Figura 3.

### 1.4.6. p60

A proteína p60, de aproximadamente 60 kDa, pertence à família das autolisinas e está associada à invasão de células fagocíticas não profissionais. O gene que codifica para esta proteína é o gene *iap* que é fundamental para a viabilidade da célula e que desempenha um papel importante na divisão celular (Wuenscher *et al.*, 1993). Segundo Humann *et al.* (2007) esta proteína pode atuar sobre as células infectadas e aumentar, indiretamente, a atividade das células NK e a produção de IFN-gama que, presumivelmente, promove a replicação bacteriana

precoce através dos seus efeitos sobre as células do sistema imune. Assim, a indução simultânea da produção de IFN-gama e de fatores que inibem a sinalização de IFN-gama pode ser uma estratégia precoce para despistar a resposta imunitária antibacteriana (Humann *et al.*, 2007).

#### 1.4.7. VirR

O gene *virR* é um gene regulador de virulência que codifica para um regulador putativo de resposta de um sistema de dois componentes (Mandin *et al.*, 2005). A deleção deste gene leva a diminuições drásticas na virulência de *L. monocytogenes*, em ratinhos e na invasão de culturas de linhas celulares (Liu, 2008). VirR regula 12 genes diferentes e controla a virulência através da regulação global de modificações de componentes de superfície que podem afetar as interações com as células do hospedeiro (Mandin *et al.*, 2005).

### 1.5. Sobrevivência de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas

A sobrevivência e o crescimento de *L. monocytogenes* a temperaturas de refrigeração são fatores que tornam difícil o controlo deste patógeno (Rocourt & Bille, 1997)

São conhecidos diferentes mecanismos para a sua sobrevivência e crescimento a baixas temperaturas. A compreensão destes mecanismos é muito importante de modo a possibilitar o desenvolvimento de métodos de controlo eficazes para este patógeno.

#### 1.5.1. Alterações na composição da membrana

As alterações de temperatura podem levar à alteração da composição lipídica da membrana, de modo a manter a fluidez ideal necessária à atividade enzimática adequada e ao transporte de solutos. O crescimento a baixas temperaturas também resulta num aumento da percentagem de ácidos gordos insaturados (anteiso-C15:0), o que também ajuda a aumentar a fluidez da membrana (Gandhi & Chikindas, 2007; Miladi *et al.*, 2013). Sabe-se também que

ocorre um encurtamento dos ácidos gordos, que leva a uma diminuição das interações carbono-carbono entre cadeias vizinhas da membrana celular ajudando, mais uma vez, a manter a fluidez da membrana e permitindo o crescimento de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas (Beales, 2004).

### **1.5.2. Alterações na expressão de genes e indução de proteínas**

*L. monocytogenes* produz proteínas de choque térmico-CSPs (*Cold Shock Proteins*) em resposta a choques de temperatura, e proteínas de aclimação ao frio-Caps (*Cold-Acclimation Proteins*) que são sintetizadas durante o crescimento a baixas temperaturas. A aclimação ao frio de um patógeno é acompanhada por mudanças na sua expressão gênica, por exemplo, os RNAs são sintetizados em níveis mais elevados quando *L. monocytogenes* é cultivada a 10 °C em comparação com 37 °C (Liu *et al.*, 2002). O aumento da expressão de mRNA indica que certas enzimas podem estar envolvidas na degradação de polipeptídeos anormais ou danificados que surgem devido ao crescimento a baixas temperaturas.

### **1.5.3. Solutos compatíveis como crioprotetores**

*L. monocytogenes* tem a capacidade de acumular solutos compatíveis, tais como glicina, betaína e carnitina que funcionam como crioprotetores. A crioproteção mediada por solutos, estimula o crescimento em células submetidas ao stresse pelo frio (Angelidis & Smith, 2003) e deleções destes transportadores de osmólitos reduzem o crescimento de *Listeria* a baixas temperaturas (Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004)

### **1.5.4. Papel do fator alternativo sigma B ( $\sigma^B$ )**

O fator sigma B ( $\sigma^B$  ou SigB), codificado pelo gene *sigB*, é um regulador de stresse em geral, tem um papel importante na regulação positiva direta de pelo menos 160 genes, incluindo a regulação da transcrição de genes de virulência como *prfA*, *inlA* e *inlB* (Kazmierczak

*et al.*, 2006; Oliver *et al.*, 2010). Vários genes regulados por PrfA também são dependentes de  $\sigma^B$ , o que sugere que exista interação entre os dois reguladores (Kazmierczak *et al.*, 2006).

A Identificação do regulão  $\sigma^B$  em *L. monocytogenes*, combinada com estudos de proteômica (Abram *et al.*, 2008) e análises fenotípicas de mutantes  $\sigma^B$ - nulos forneceram evidências consideráveis de que  $\sigma^B$  contribui decisivamente para a capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar e sobreviver, tanto em hospedeiros mamíferos como em condições de stresse encontradas em diferentes tipos de ambientes (Gray *et al.*, 2006).

O fator sigma B, além das suas funções regulatórias, contribui para a sobrevivência bacteriana após exposição a fatores de stresse ambientais, incluindo baixos valores de pH, stresse oxidativo, stresse de energia e ainda stresse térmico (Wiedmann *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2001; Chaturongakul & Boor, 2004; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004). O fator alternativo  $\sigma^B$  é estimulado em resposta a abaixamentos de temperatura. Mutantes sem este fator perdem a capacidade de acumular os solutos compatíveis descritos no ponto anterior (Becker *et al.*, 2000). Isto sugere que uma das funções de  $\sigma^B$  durante o crescimento a baixas temperaturas, é a acumulação de crioprotetores.

## **1.6. Efeito de temperaturas de refrigeração na virulência de *L. monocytogenes***

O efeito das temperaturas de refrigeração na virulência de *L. monocytogenes* é um assunto de grande importância, em termos de segurança alimentar. Czuprynski *et al.* (1989) e Stephens *et al.* (1991) relataram um aumento na virulência de *L. monocytogenes*, a 4 °C, quando inoculadas em murganhos por via intravenosa. No entanto, Stephens *et al.* (1991), num estudo semelhante, relataram não terem encontrado aumento na virulência de estirpes de *L. monocytogenes* em murganhos quando inoculados *per os*. Brackett & Beuchat (1990), através de inoculação intraperitoneal de murganhos com uma estirpe de *L. monocytogenes* crescida em carne de caranguejo refrigerada (5 °C), não observaram alterações na virulência de *L. monocytogenes*. Myers & Martin (1994) obtiveram resultados semelhantes com outra estirpe crescida em meio de cultura a 4 °C, assim como Galdiero *et al.* (1997) que relataram

não encontrar alterações na capacidade de *L. monocytogenes* invadir a linha de células epiteliais Caco-2, após 48 horas de armazenamento a 4 °C.

Mais recentemente, Duodu *et al.* (2010) analisaram alterações na virulência de duas estirpes de *L. monocytogenes*, crescidas em salmão, quando armazenadas a 0, a 4 e a 20 °C. Os resultados evidenciaram que a estirpe pouco virulenta não sofria alterações na sua virulência a 0 e a 4 °C mas que esta aumentava significativamente quando o armazenamento era a 20 °C.

Pricope-Ciolacu *et al.* (2013) avaliaram, através de ensaios com a linha celular Caco-2, o efeito dos componente do leite e as condições de armazenamento, na virulência de *L. monocytogenes*, e concluíram que com o aumento do tempo de armazenamento à temperatura de 4 °C, o número de células bacterianas aumentava, mas diminuía a sua virulência *in vitro*.

Em todos estes estudos, os isolados encontravam-se em ambientes que permitiam o seu crescimento. No entanto, estudos que avaliem o efeito da temperatura de refrigeração na viabilidade e na virulência desta bactéria, na ausência de nutrientes, são raros.

### **1.7. Avaliação, *in vitro*, do potencial virulento em *L. monocytogenes***

*L. monocytogenes* é considerada uma espécie patogénica. No entanto, esta espécie é constituída por uma variedade de estirpes com diferentes potenciais de virulência. Tanto existem estirpes muito virulentas, como existem outras relativamente pouco virulentas e com pouco impacto para o hospedeiro, devido à sua incapacidade de causar danos no mesmo. Assim sendo, a disponibilidade de métodos laboratoriais precisos para avaliar a virulência desta espécie é muito importante para um eficiente controlo e prevenção da listeriose (Liu, 2006).

Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos vários métodos para a avaliação do potencial virulento de *L. monocytogenes*, incluindo ensaios *in vivo*, sendo os murganhos os



animais mais utilizados, ensaios *in vitro* com culturas celulares e detecção de proteínas e genes associados à virulência (Hof, 1984; Roche *et al.*, 2001; Liu, 2006; Shen *et al.*, 2013).

Ensaio *in vitro*, em culturas de células animais, têm sido largamente usados como alternativa menos dispendiosa aos ensaios *in vivo* em murganhos. Estes métodos permitem estudar vários efeitos de *L. monocytogenes*, em diferentes linhagens de células animais, tais como efeitos citopatogénicos, crescimento intracelular e invasão célula a célula, capacidade de aderir e invadir as células, entre outros (Pine *et al.*, 1991; Roche *et al.*, 2001; Olier *et al.*, 2002; Liu, 2006).

Nestes ensaios, têm sido usadas, entre muitas outras, a linha celular Caco-2 e a linha celular HT-29, ambas originárias de adenocarcinomas humanos. A linha celular Caco-2, apresenta um aumento na taxa de multiplicação após a entrada de *L. monocytogenes* nas células epiteliais. Ao contrário das Caco-2, e na presença de glucose, as células HT-29 apresentam uma taxa de proliferação constante e independente da infeção por *L. monocytogenes* (Zweibaum *et al.*, 1985).

## **1.8. Enquadramento do trabalho e objetivos**

Como foi referido anteriormente, *L. monocytogenes* consegue crescer a temperaturas de refrigeração. Por este motivo, após a contaminação inicial dos alimentos, a sua presença pode ser significativa, particularmente em alimentos RTE refrigerados, desde que os fatores intrínsecos e extrínsecos permitam a sua sobrevivência e/ou o seu crescimento.

Além da sobrevivência e do crescimento de *L. monocytogenes* em condições de stresse, a avaliação do potencial de virulência das estirpes nas mesmas condições é fundamental para averiguar o risco real da presença desta bactéria em matrizes alimentares.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar, na ausência de nutrientes, o possível papel do stresse térmico (7 °C) e do respetivo tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na virulência de um conjunto de estirpes de *L. monocytogenes*, usando como termo de comparação a

exposição a 37 °C, mantendo constantes as outras condições. Para este estudo, foi utilizado o protocolo de formação de placas-PFA (*Plaque Forming Assay*) com a linha de células epiteliais humanas HT-29. Simultaneamente, foi também avaliada a viabilidade bacteriana nas mesmas condições anteriormente descritas.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Estirpes bacterianas e linhagem celular

As bactérias utilizadas neste estudo encontravam-se conservadas a – 80 °C em meio de cultura TSB-YE com 20% (v/v) de glicerol. Após o seu descongelamento, foram riscadas diretamente em meio TSA-YE e incubadas durante a noite a 37 °C. Os diferentes isolados de *L. monocytogenes* usados têm diferentes origens e estão descritos na tabela 2.

De modo a avaliar o potencial virulento de *L. monocytogenes*, foi realizada a infecção da linha celular animal HT-29 (ECACC – *European Collection of Cell Cultures*, Salisbury, UK), inicialmente isolada de um adenocarcinoma primário do colón de uma paciente caucasiana de 44 anos, com os isolados bacterianos em estudo. A infecção foi feita usando as passagens de 55 a 80 desta linha celular.

Tabela 2 - Isolados utilizados neste estudo e respetivas origens

Referência (nº CBISA)	Serótipo	Origem / (Fonte)
3001	4b	CECT 4032
3992	1/2a	Animal (EGDe) / (Roche <i>et al.</i> , 2005)
3993	4d/4e	Produto Alimentar (442) / (Roche <i>et al.</i> , 2005)
3046	1/2a	Leite Crú / (Cabrita <i>et al.</i> , 2004)
3049	1/2a	Leite Crú / (Cabrita <i>et al.</i> , 2004)
3077	4b	Queijo de ovelha / (Leite <i>et al.</i> , 2006)
3130	1/2a	Queijo de ovelha / (Leite <i>et al.</i> , 2006)
3172	4b	Escovas do lavador de queijo / (Leite <i>et al.</i> , 2006)
3219	4b	Queijo de ovelha / (Leite <i>et al.</i> , 2006)
4003	1/2c - 3c	Hamburguer (sem tempero) / (Neves, 2009)
4011	1/2b - 3b	Sandes Americana / (Neves, 2009)

## 2.2. Meios de cultura

Para o crescimento bacteriano, foram utilizados os meios TSA-YE (*Tryptic Soy Agar – Yeast Extract*) e o meio TSB (*Tryptic Soy Broth*).

Na manutenção da linha celular HT-29 foi utilizado o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Para a infecção do tapete celular foi ainda utilizado o meio D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

### 2.2.1. TSB e TSA-YE

O meio TSB, comercializado pela Biokar Diagnostics, Beauvais, França, foi preparado conforme as instruções do fabricante, juntando-se 30 g deste a 1 litro de água desmineralizada. O meio foi posteriormente esterilizado em autoclave por 15 minutos à temperatura de 121 °C.

Na preparação do meio de cultura TSA-YE, foram utilizadas 30 g/L de meio TBS suplementado com 6 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de Agar. Após diluídos todos os componentes, o meio foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Posteriormente foi distribuído em caixas de Petri e armazenado à temperatura ambiente.

### 2.2.2. RPMI 1640

O meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), comercializado pela Sigma-Aldrich St, Louis, MO, Estados Unidos da América, foi utilizado tanto na manutenção da linha celular humana HT-29, como em todos os ensaios. Para a manutenção da linha celular, este meio foi suplementado com L-glutamina (2 mM), SBF (soro bovino fetal) 10% (v/v) e com penicilina (100 UI/mL) e estreptomomicina (100 µg/mL), com exceção do meio utilizado 24 h antes do ensaio de PFA, ao qual estes antibióticos não foram adicionados.

### 2.2.3. D-MEM

O meio de cultura D-MEM (Gibco/Invitrogen, Paisley, Escócia) foi utilizado nos ensaios de formação de placas. Este meio foi suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio e o seu valor de pH foi acertado a 7,2 – 7,3. Posteriormente, esterilizou-se o meio através de filtração em membrana esterilizada com 0,22 µm de diâmetro de poro. Após distribuição do meio, já esterilizado, em tubos Falcon de 50 mL conservou-se o mesmo à temperatura de refrigeração (2-8 °C).

## 2.3. Soluções utilizadas nos ensaios de PFA e na manutenção da linha celular

Para os ensaios de formação de placas e manutenção da linha celular, as soluções utilizadas foram: solução de tripsina-versène, solução de soro fetal bovino inativado, solução de soro fisiológico tamponado, solução tampão fosfato-salino, solução mistura de penicilina e estreptomicina, solução de gentamicina, solução de L-glutamina e solução corante de azul de tripano.

### 2.3.1. Tripsina-Versène (ATV)

A composição desta solução, utilizada na tripsinização da linha celular HT-29 e nos ensaios de aderência e invasão, está descrita na tabela 3. Dissolveram-se todos os componentes em água esterilizada, e posteriormente acertou-se o pH a 7,1 – 7,2 seguido de esterilização por filtração com membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro. Esta solução foi armazenada a -20 °C até à sua utilização.

**Tabela 3 - Composição da solução de Tripsina-Versène**

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
<b>Cloreto de sódio (NaCl)</b>	8,0
<b>Cloreto de potássio (KCl)</b>	1,0
<b>Glucose monohidratada (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>*H<sub>2</sub>O)</b>	1,1
<b>Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)</b>	0,58
<b>EDTA dihidratado (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>*2H<sub>2</sub>O)</b>	0,2
<b>Tripsina (Gibco/Invitrogen)</b>	2,0

### **2.3.2. Soro bovino fetal (SBF)**

O soro bovino fetal (Gibco/Invitrogen Paisley, Escócia) foi descongelado durante a noite à temperatura de refrigeração. Para se dar uma descongelação completa, colocou-se o soro em banho de água a 37 °C e, após completamente descongelado, manteve-se à mesma temperatura durante 15 minutos. Seguidamente, aumentou-se a temperatura do banho para 56 °C e quando atingida essa temperatura voltou-se a colocar o soro no banho por 35 minutos adicionais. O frasco que continha o soro foi ligeiramente agitado de 10 em 10 minutos. Finalmente, depois de arrefecido à temperatura ambiente, distribuiu-se o soro em tubos Falcon de 50 mL e armazenou-se à temperatura de -20 °C.

### **2.3.3. Soro fisiológico tamponado**

Para a preparação do soro fisiológico tamponado, juntou-se 8,5 g de cloreto de sódio (NaCl), 1,0 g de fosfato monopotássico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) e 2,0 g de hidrogenofosfato de potássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a um Litro de água destilada esterilizada e, após a dissolução de todos os componentes, acertou-se o pH a 6,85 e esterilizou-se a solução em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

#### 2.3.4. Tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline – PBS*)

Na preparação da solução tampão fosfato salino usaram-se os componentes descritos na tabela 4. Após a dissolução de todos os componentes em água destilada foi ajustado o valor de pH entre 7,2 e 7,4. A solução foi esterilizada em autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

Tabela 4 - Composição da solução tampão fosfato-salino

Componente	Concentração (g/L)
Cloreto de sódio (NaCl)	8,5
Cloreto de potássio (KCl)	0,2
Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,24
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,44

#### 2.3.5. Solução mistura de penicilina e estreptomicina

Preparou-se uma solução mistura de penicilina (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América) a  $2 \times 10^4$  UI/mL e de estreptomicina (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América) a 20 mg/mL, que foi posteriormente esterilizada por filtração em membrana esterilizada de 0,22 µm de diâmetro de poro. A solução foi distribuída em alíquotas de 2 mL e armazenada à temperatura de -20 °C

#### 2.3.6. Solução de gentamicina

A solução de gentamicina a 50 mg/mL (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América) foi esterilizada pelo mesmo processo de filtração descrito no ponto anterior, distribuída em alíquotas de 2 mL e armazenada à temperatura de refrigeração (2 – 8 °C)

### **2.3.7. Solução de L-glutamina**

A solução de L-glutamina (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos da América) a 2 mM foi descongelada e posteriormente esterilizada por filtração, tal como descrito nos pontos anteriores. Foi também esta solução distribuída em alíquotas de 2 mL e armazenada à temperatura de -20 °C.

### **2.3.8. Solução corante de azul de tripano**

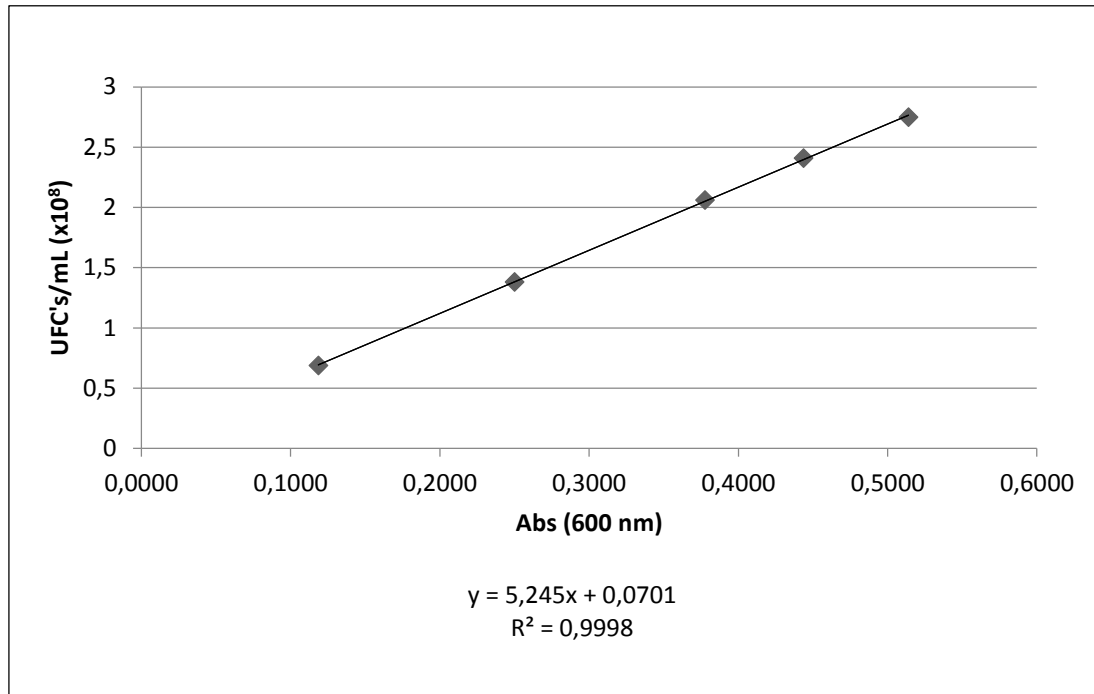
Foi feita uma solução aquosa de azul de tripano (Riedel-de Haën, Seelz, Alemanha) a 0,4 % (m/v) em água destilada.

## **2.4. Preparação das suspensões bacterianas**

As estirpes em estudo foram inoculadas, por riscado, em meio TSA-YE e incubadas a 37 °C durante a noite. No dia seguinte, a partir destas placas, inocularam-se as bactérias em 20 mL de meio TSB e incubou-se nas mesmas condições. No dia do ensaio, centrifugou-se a cultura bacteriana crescida durante a noite a 3000 g durante 5 minutos. Após a centrifugação, lavou-se duas vezes com 20 mL de soro fisiológico tamponado e por fim, ressuspendeu-se o sedimento em 20 mL da mesma solução.

Utilizando a reta de calibração representada na figura 4, ajustou-se a concentração da suspensão de cada estirpe bacteriana a  $1 \times 10^8$  UFC/mL em meio DMEM, num volume final de 1 mL, para o dia 0, e a  $2 \times 10^8$  UFC/mL em soro fisiológico tamponado, num volume final de 0,5 mL para os ensaios correspondentes aos dias 1 e 7.





**Figura 4 - Curva de calibração para a estirpe de referência CBISA 3001 em soro fisiológico tamponado.** Os valores de absorvância foram determinados utilizando um espectrofotômetro (BOECO, Hamburgo, Alemanha)

#### **Preparação das diluições decimais das suspensões bacterianas**

Depois de preparadas as suspensões bacterianas, foram feitas, imediatamente, diluições decimais das mesmas em meio DMEM ou soro fisiológico tamponado (dependendo do dia do ensaio) até à concentração de  $10^2$  UFC/mL. Estas diluições foram efetuadas para os ensaios relativos a cada tempo de incubação, a cada uma das temperaturas, 7 °C e 37 °C. Findo cada período de incubação (1 e 7 dias), imediatamente antes da infecção do tapete celular, adicionou-se a cada um dos tubos 0,5 mL de meio D-MEM completo 2 × concentrado.

De modo a determinar o número de células viáveis dos inóculos (tempos 0, 1 e 7 dias), procedeu-se à inoculação, em duplicado, de placas de TSA-YE com 100 µL de inóculo seguido de espalhamento e contagem após 24 horas de incubação a 37 °C.

## 2.5. Manutenção da linha celular animal

A linha celular animal HT-29 foi cultivada em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Orange Scientifique, Braine-l'Alleud, Bélgica) com meio RPMI 1640 completo, isto é, suplementado com 10 % (v/v) de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e incubada a 37 °C em estufa com 90 % de humidade e 5 % (v/v) de CO<sub>2</sub> em ar. A manutenção foi feita semanalmente, efetuando-se a tripsinização das células, seguida de uma mudança de meio de cultura RPMI 1640 completo após três dias, e nova tripsinização três dias após esta mudança de meio.

### Procedimento para a tripsinização da linha celular animal

A tripsinização das células HT-29 foi feita quando o tapete celular, observado com microscópio invertido (Leica, Wetzlar, Alemanha), apresentava uma confluência elevada (densidade elevada). A figura 5 mostra a diferença de densidades (baixa/elevada) vista ao microscópio.

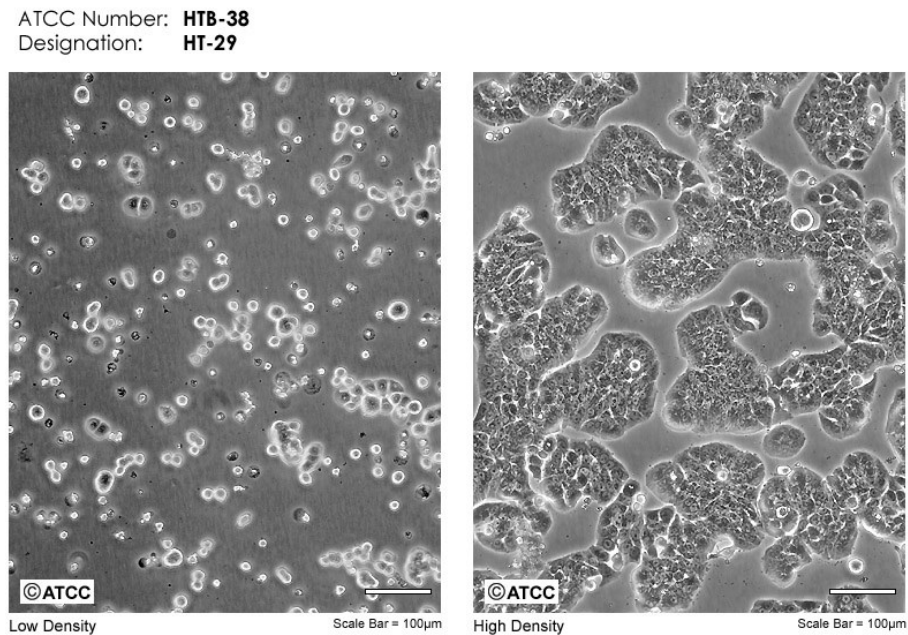


Figura 5 - Cultura de células da linhagem HT-29 com densidade baixa (esquerda) e elevada (direita). Foto disponível em <http://www.lgcstandards-atcc.org>

Para a tripsinização do tapete celular procedeu-se à eliminação do meio contido no frasco de cultura das células, sem tocar ou perturbar o tapete celular. Seguidamente, lavou-se o tapete com 3 mL de soro fisiológico tamponado, rejeitou-se o soro e adicionou-se o mesmo volume de ATV que foi igualmente rejeitado de seguida. Adicionou-se 4 mL de ATV e deixou-se incubar por um período de 15 minutos a 37 °C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Ao fim do tempo de incubação, desprende-se o aglomerado de células do fundo do frasco com o auxílio de uma pipeta e transferiram-se as células para um tubo cónico de 50 mL (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica) contendo 4 mL de SBF. Lavou-se o frasco duas vezes com soro fisiológico tamponado, 8 e 1 mL respetivamente, que se adicionou ao mesmo tubo após a lavagem. Finalmente o tubo contendo as células foi a centrifugar (1000 g) durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, eliminou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 2,7 mL de meio RPMI 1640 completo. Depois de bem homogeneizado, adicionou-se 1 mL desta suspensão celular a um novo frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> contendo 24 mL de meio RPMI 1640 completo. A cultura celular foi então colocada a incubar nas condições anteriormente escritas.

## 2.6. Ensaio de formação de placas (*Plaque Forming Assay* – PFA)

Os ensaios de PFA foram realizados aos dias 0 (virulência inicial), e no final de 1 e 7 dias de incubação de cada uma das estirpes às duas temperaturas, em soro fisiológico tamponado, ou seja sem nutrientes. As temperaturas testadas foram uma temperatura de refrigeração (7 °C) e a temperatura ótima para o crescimento de *L. monocytogenes* (37 °C).

Para este ensaio, a cultura de células animais usada foi preparada três dias antes de cada ensaio. Após a tripsinização das células animais, reservou-se um tubo cónico com o sedimento obtido e ressuspendeu-se o mesmo em 2,7 ml de meio de cultura RPMI completo. Depois de homogeneizado, preparou-se uma mistura de 50 µl de suspensão celular e 250 µl do corante azul de tripano. Fez-se a contagem do número de células viáveis (não coradas) em câmara de hemocítmetro (Neubauer, W-Germany) recorrendo para isso a microscópio

invertido. Inoculou-se então, numa microplaca de 96 poços (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Bélgica), 100 µl de suspensão de células animais com uma concentração de  $3,2 \times 10^5$  células/mL em cada poço. Os poços exteriores da placa não foram utilizados e foi-lhes adicionado o mesmo volume de soro fisiológico, de modo a evitar a evaporação, nos poços em ensaio.

Incubaram-se as microplacas em estufa com 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> em ar, a 37 °C durante 3 dias. Findo esse período substituiu-se o meio de cultura RPMI completo pelo mesmo meio sem antibióticos e voltou-se a incubar nas mesmas condições, por mais 24 h.

### **2.6.1. Infecção do tapete celular**

Aspirou-se o meio de cultura existente em cada um dos poços e, de seguida, iniciou-se a deposição das diferentes concentrações bacterianas nos mesmos. Para cada estirpe, colocou-se 25 µL de cada uma das diluições, em dois poços consecutivos, para assim obter concentrações de 10<sup>7</sup> a 10<sup>2</sup> UFC/mL de *L. monocytogenes*, em cada dois poços. As placas foram então incubadas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub> (v/v) durante duas horas.

### **2.6.2. Eliminação das bactérias extracelulares**

Findo o período de duas horas de incubação com os inóculos, voltou-se a aspirar o conteúdo dos poços e adicionou-se meio de cultura com gentamicina na concentração de 100 µg/mL, para eliminar as bactérias extracelulares, e incubou-se por mais 90 minutos nas condições descritas anteriormente.

### **2.6.3. Deposição da agarose**

Preparou-se meio de cultura RPMI com gentamicina na concentração de 10 µg/mL. A 12,3 mL deste meio adicionou-se 2,7 mL de agarose (Gibco/Invitrogen Paisley, Escócia) (2,5% (m/v)). Após os 90 minutos de incubação, eliminou-se o conteúdo dos poços e colocou-se 100

µL do meio de cultura com agarose em cada poço e esperou-se que solidificasse. Após solidificado, adicionou-se ainda 50 µL de meio de cultura com gentamicina (10 µg/mL) sem agarose e incubou-se novamente a placa, nas mesmas condições até agora descritas, durante 24 horas.

#### **2.6.4. Contagem das placas de lise**

Findas as 24 horas de incubação, contou-se o número de placas de lise formadas nos poços, com o auxílio de um microscópio invertido.

#### **2.6.5. Expressão e análise estatística dos resultados**

O potencial virulento das estirpes testadas foi expresso como a média dos logaritmos decimais (log) do número de placas de lise formadas (PFA), em duplicado, em três ensaios biológicos independentes, correspondentes a  $10^7$  *Listeria*. A partir dos valores de log de PFA obtidos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), estirpe a estirpe, em que os fatores considerados foram o tempo e a temperatura.

A viabilidade das estirpes testadas foi expressa como a média dos logaritmos decimais (log) do número de bactérias viáveis (UFC/mL) em duplicado, em três ensaios independentes. A partir dos valores de log de viabilidades obtidos, foi realizada uma análise de variância (ANOVA), estirpe a estirpe, em que os fatores considerados foram, tal como para a virulência, o tempo e a temperatura.

A ANOVA foi realizada utilizando o teste de comparação múltipla *post hoc* LSD (*Least Significant Differences*) com recurso ao programa *Statistica*<sup>TM</sup>, versão 10, da Statsoft, EUA. Em todas as análises de variância foi utilizado um grau de significância de 95% ( $P < 0,05$ ).

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1. Efeito do tempo e da temperatura na virulência de *L. monocytogenes*

Neste estudo foram utilizados 10 isolados de *L. monocytogenes*, incluindo as estirpes de referência para estirpe virulenta CBISA 3992 (EGDe) e para estirpe pouco virulenta CBISA 3993 (442). Os 10 isolados utilizados tinham origens diversas, conforme descrito na tabela 2. Relativamente à serotipagem, quatro dos isolados pertenciam ao serótipo 1/2a, três isolados ao serótipo 4b, um isolado ao serótipo 4d/4e, um ao serogrupo 1/2b - 3b e um ao serogrupo 1/2c - 3c.

Foram realizados ensaios de formação de placas de lise (PFA) em monocamadas da linha celular animal HT-29, antes e após os tempos de exposição (0, 1 e 7 dias), às temperaturas de 7 °C e 37 °C em condições de stresse nutritivo (ausência de nutrientes).

Na tabela 5 encontram-se representados os efeitos destes fatores na virulência e na viabilidade de cada uma das estirpes estudadas.

Tabela 5 - Efeitos dos fatores tempo, temperatura e respetiva interação na virulência e viabilidade de cada uma das estirpes de *L. monocytogenes* estudadas

Estirpe	Fator	Virulência	Viabilidade
EGDe <sup>1</sup>	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	**	**
442 <sup>2</sup>	Tempo	**	**
	Temperatura	**	**
	Tempo x Temperatura	**	**
3130	Tempo	**	**
	Temperatura	*	**
	Tempo x Temperatura	NS	**
4003	Tempo	**	**
	Temperatura	**	**
	Tempo x Temperatura	**	**
4011	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	*	**
3046	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	NS	**
3049	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	NS	**
3077	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	NS	**
3172	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	NS	**
3219	Tempo	**	**
	Temperatura	NS	**
	Tempo x Temperatura	NS	**

\*(p<0,05); \*\*(p<0,01); NS –Não significativo

<sup>1</sup> EGDe = CBISA 3992 - Referência para estirpe virulenta;

<sup>2</sup> 442 = CBISA 3993 - Referência para estirpe pouco virulenta

No que diz respeito ao efeito destes fatores na virulência dos isolados pode verificar-se que varia com a estirpe. Para a estirpe virulenta de referência, EGDe, podemos verificar que o tempo de exposição afeta muito significativamente a virulência deste isolado (p<0,01), assim como o efeito conjunto do tempo e da temperatura (p <0,01), enquanto a temperatura, *per se*, não teve efeito significativo (p>0,05) na virulência deste isolado. Para as estirpes pouco

virulenta de referência, 442, e 4003 observou-se que ambos os fatores, bem como a sua interação, afetaram significativamente a virulência destes isolados ( $p < 0,01$ ). Na estirpe 3130, ambos os fatores, tempo e temperatura, afetaram significativamente a virulência deste isolado, tendo o tempo tido um efeito mais significativo ( $p < 0,01$ ) que a temperatura ( $p < 0,05$ ). Para a estirpe 4011, mais uma vez o tempo foi o fator que mais afetou a virulência do isolado ( $p < 0,01$ ), tendo também, o tempo e a temperatura em conjunto, influenciado a virulência mas com um menor grau de significância ( $p < 0,05$ ). Neste isolado, mais uma vez, a temperatura não teve efeitos significativos na virulência. Finalmente, para os restantes isolados (3046, 3049, 3077, 3172 e 3219), apenas o tempo teve efeito significativo na virulência ( $p < 0,01$ ).

A tabela 6 mostra, para cada estirpe, os valores respeitantes à virulência (log PFA) obtidos, e respetivos desvios padrão, nas condições estudadas.

**Tabela 6 - Efeito do tempo de exposição às temperaturas de 7 °C e 37 °C na virulência (log PFA) de 10 isolados de *L. monocytogenes*, em condições de stresse nutritivo.**

Isolado	Temperatura (°C)				
	7 °C			37 °C	
	Tempo (dias)				
	0	1	7	1	7
EGDe	5,90±0,147	4,78±0,115	2,50±0,339	2,87±0,630	4,74±0,189
442	4,19±0,191	3,80±0,030	2,46±0,255	3,01±0,636	N/D
3130	6,04±0,180	5,27±0,302	3,92±0,041	4,66±0,571	3,32±0,359
4003	5,78±0,460	3,64±0,331	2,25±0,072	2,67±0,289	N/D
4011	6,07±0,067	4,38±0,670	3,90±0,025	4,94±0,869	2,78±0,489
3046	2,13±0,339	N/D	N/D	N/D	N/D
3049	2,71±0,216	N/D	N/D	N/D	N/D
3077	5,14±0,201	5,72±0,182	4,22±0,171	5,03±0,741	4,72±0,612
3172	5,29±0,164	5,83±0,117	4,60±1,025	5,67±0,396	4,80±0,319
3219	5,26±0,213	5,87±0,391	4,34±0,196	5,56±0,905	4,45±0,560

N/D – Não detetado



Os resultados referentes ao efeito da temperatura na virulência de cada um dos isolados encontram-se representados na figura 6.

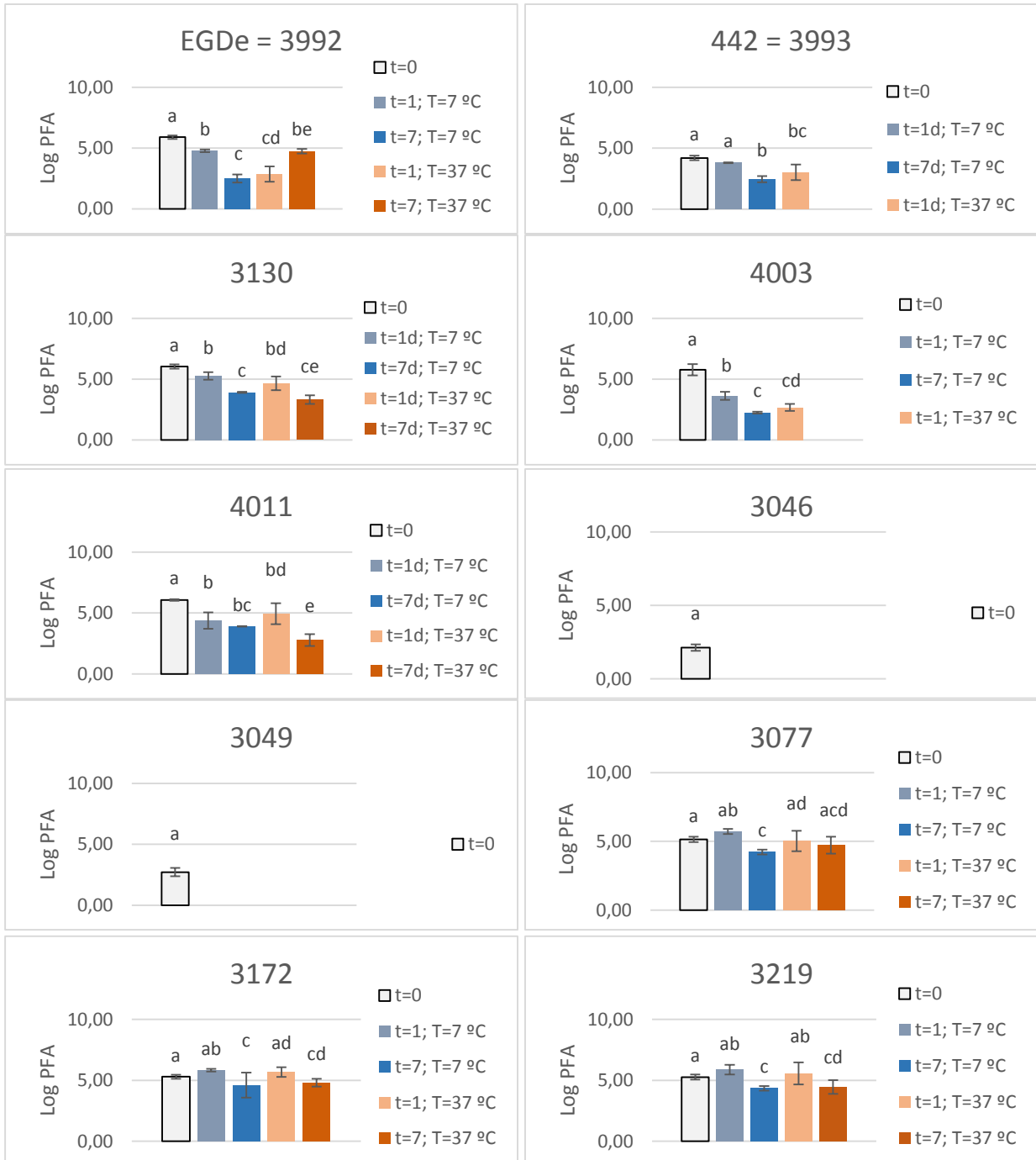


Figura 6 - Valores médios de virulência (log PFA) de cada uma das estirpes de *L. monocytogenes* de acordo com a temperatura (7 °C e 37 °C) e o tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na ausência de nutrientes.

As barras de erro representam o desvio padrão.

Para cada estirpe, letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias (p < 0,05)

Para a virulência inicial, foi possível verificar que os isolados 442 (utilizado como referência para baixa virulência), 3046, 3049 e 3077 apresentavam valores de virulência inicial significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) quando comparados com o valor de virulência inicial correspondente à estirpe virulenta EGDe (resultados não apresentados). Os isolados 3046 e 3049, quando comparados com a estirpe 442, apresentam valores de log PFA inicial significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) aos desta estirpe pouco virulenta (resultados não apresentados).

Relativamente ao efeito da temperatura de 7 °C, ao longo do tempo de exposição, na virulência dos isolados, verificou-se uma diminuição significativa da virulência em todos os isolados, embora para as estirpes 442, 3077, 3172 e 3219 esta redução da virulência apenas foi significativa ( $p < 0,05$ ) ao fim de 7 dias (Figura 6). Para o isolado 4011 os resultados obtidos mostram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da virulência logo após 1 dia de exposição à temperatura de refrigeração, e até aos 7 dias este abaixamento no valor da virulência manteve-se sem alteração significativa (Figura 6). Os isolados EGDe, 3130 e 4003 apresentam uma diminuição da virulência ao fim de 1 dia de exposição. Esta diminuição continua a verificar-se de modo significativo ao fim de 7 dias, sendo que para EGDe e 3130 a diminuição é mais significativa do dia 1 para o dia 7, e para 4003 a diminuição é maior do tempo 0 para o dia 1 (Figura 6). Relativamente às estirpes 3046 e 3049, apenas foi possível determinar o valor de PFA inicial não tendo sido possível avaliar o efeito da temperatura nestes isolados. De fato, a virulência destes isolados, que apresentava um valor inicial muito baixo, continuou a diminuir para lá do limite de deteção do método.

Relativamente ao efeito da temperatura de 37 °C, ao longo do tempo de exposição, na virulência dos isolados, verificou-se que, para os isolados EGDe, 442, 3130, 4003, e 4011, se verificou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da virulência inicial ao fim de apenas 1 dia (Figura 6). Os isolados 3130 e 4011 continuam a apresentar uma diminuição significativa da virulência ao fim de 7 dias enquanto, curiosamente, o isolado EGDe tem um aumento significativo da virulência do dia um para o dia 7 apresentando, no entanto, um valor de log

PFA significativamente mais baixo que o valor inicial (Figura 6). Para os isolados 442 e 4003 não foi possível determinar o valor de PFA ao fim de 7 dias a esta temperatura, provavelmente pela perda acentuada de viabilidade a esta temperatura na estirpe 442, como se poderá verificar no ponto 3.2 e no isolado 4003 possivelmente pela diminuição acentuada na virulência que ultrapassou o limite de deteção do método. No isolado 3077 verificou-se que não houve alterações significativas ( $p>0,05$ ) da virulência ao fim de 1 e 7 dias. Finalmente, nos isolados 3172 e 3219 apenas se verificou uma diminuição significativa da virulência ao fim de 7 dias. Relativamente às estirpes 3046 e 3049 apenas foi possível determinar o valor de PFA para a virulência inicial, como referido anteriormente, não tendo sido possível avaliar, também, o efeito desta temperatura nestes isolados.

A informação existente, relativa ao efeito da temperatura na virulência de *L. monocytogenes*, é escassa. Em estudos anteriores, em que foram utilizadas suspensões de *L. monocytogenes* armazenadas a temperaturas de refrigeração em soluções salinas isotónicas, foram obtidos resultados semelhantes, ou seja, foi observada uma diminuição da virulência deste patógeno ao longo do tempo nestas condições (Buncic & Avery, 1996; Buncic *et al.*, 1996; Avery & Buncic, 1997).

Buncic *et al* (2001) concluíram que isolados com o serótipo 4b tendiam a apresentar uma maior virulência após armazenamento a 4 °C, testados em embriões de galinha, quando comparados com isolados do serótipo 1/2a, cuja virulência diminuía significativamente com a armazenagem à mesma temperatura.

Neste estudo, dos 10 isolados analisados, os maiores abaixamentos na virulência, à temperatura de 7 °C, foram observadas nos isolados com sérotipos 1/2a (EGDe e 3130) e 1/2c (4003) e 1/2b (4011), tendo a diferença sido superior a dois log entre o valor inicial e o valor obtido ao fim de 7 dias de exposição a 7 °C. Nos isolados do serótipo 4b (3077,3172 e 3219), o abaixamento da virulência ao fim de 7 dias à temperatura de 7 °C, embora significativo, foi muito inferior ao das restantes estirpes, não tendo baixado mais do que um log para nenhum destes isolados. Neste estudo, para as estirpes 3046 e 3049 (sérotipo 1/2a) não foi possível

determinar o valor da virulência ao fim de 7 dias à temperatura de 7 °C, uma vez que o abaixamento verificado na virulência não permitiu a formação de placas de lise na concentração mais elevada em teste ( $10^8$  UFC/mL).

Os resultados obtidos a 37 °C, sugerem que a ausência de nutrientes *per se* pode causar diminuições na virulência de *L. monocytogenes*, uma vez que ao fim de 7 dias a esta temperatura a virulência dos isolados diminuiu significativamente, com exceção do isolado 3077 para o qual o valor da virulência se manteve constante a esta temperatura.

### 3.2. Efeito do tempo e da temperatura na viabilidade de *L. monocytogenes*

Em simultâneo com os ensaios de PFA foram também analisadas as viabilidades dos isolados, nas mesmas condições anteriormente descritas, ou seja, antes e após os tempos de armazenagem (0, 1 e 7 dias) às temperaturas de 7 °C e 37 °C na ausência de nutrientes.

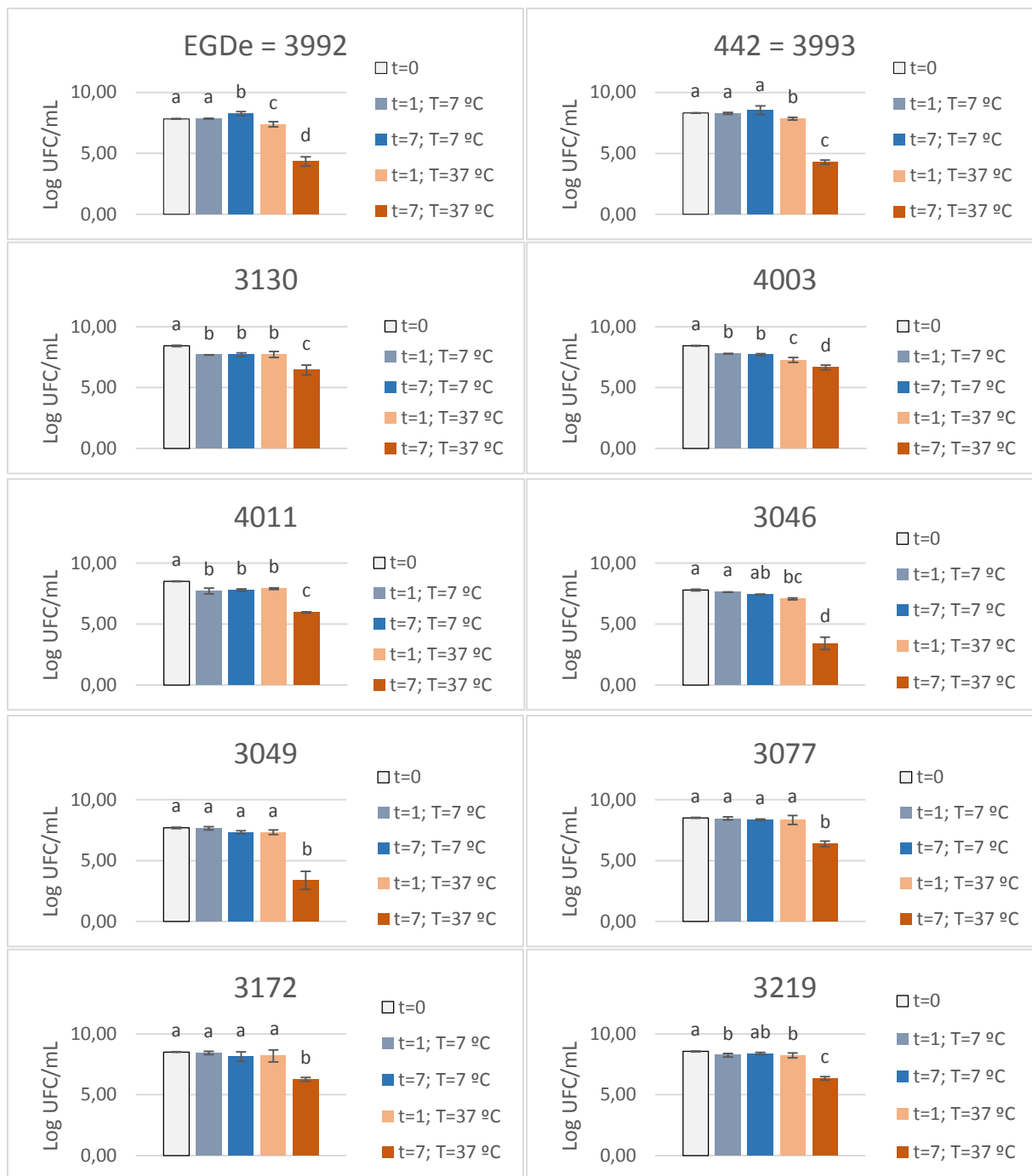
Como se pode verificar na tabela 5 (capítulo 3.1), o efeito de todos os fatores avaliados é muito significativo para a viabilidade de todos os isolados em estudo ( $p < 0,01$ ).

A tabela 7 mostra, para cada estirpe, os valores obtidos, e respetivos desvios padrão, para a viabilidade de cada uma das estirpes nas condições estudadas.

**Tabela 7 - Efeito do tempo de exposição às temperaturas de 7 °C e 37 °C na viabilidade (log UFC/mL) de 10 isolados de *L. monocytogenes* em condições de stresse nutritivo**

Isolado	Temperatura (°C)				
	7 °C			37 °C	
	Tempo (dias)				
	0	1	7	1	7
EGDe	7,83±0,011	7,85±0,029	8,26±0,171	7,39±0,205	4,34±0,373
442	8,32±0,002	8,29±0,072	8,54±0,355	7,85±0,119	4,29±0,160
3130	8,42±0,061	7,68±0,019	7,69±0,144	7,71±0,249	6,44±0,404
4003	8,42±0,003	7,77±0,021	7,68±0,087	7,27±0,201	6,64±0,188
4011	8,51±0,023	7,72±0,230	7,78±0,098	7,90±0,064	5,96±0,041
3046	7,79±0,066	7,63±0,009	7,42±0,038	7,07±0,073	3,42±0,506
3049	7,69±0,057	7,65±0,128	7,33±0,125	7,32±0,188	3,38±0,736
3077	8,51±0,043	8,46±0,125	8,35±0,058	8,33±0,362	6,38±0,228
3172	8,50±0,008	8,42±0,139	8,12±0,398	8,18±0,483	6,25±0,158
3219	8,55±0,039	8,24±0,144	8,37±0,107	8,23±0,199	6,34±0,147

Os resultados referentes ao efeito da temperatura na viabilidade dos isolados encontram-se representados na figura 7.



**Figura 7 - Valores médios de viabilidade (log UFC/mL) de cada uma das estirpes de *L. monocytogenes* de acordo com a temperatura (7 °C e 37 °C) e o tempo de exposição (0, 1 e 7 dias), na ausência de nutrientes.**

As Barras de erro representam o desvio padrão.

Para cada estirpe, letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ( $p < 0,05$ )

No respeitante à viabilidade dos isolados, para a temperatura de 7 °C, em comparação com os valores iniciais, houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) do número de bactérias viáveis, ao fim de 1 dia de exposição, no caso dos isolados 3130, 4003, 4011 e 3219 não tendo havido diferenças significativas no número de bactérias viáveis ao fim de 7 dias ( $p > 0,05$ ) para estes mesmos isolados (Figura 7). A estirpe EGDe não sofreu diferenças significativas no número de bactérias viáveis ao fim de 1 dia tendo, curiosamente, ao fim de 7 dias apresentado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) neste parâmetro (Figura 7). Os restantes cinco isolados (442, 3046, 3049, 3077, 3172) não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no número de bactérias viáveis até aos 7 dias de armazenamento nas condições anteriormente descritas (Figura 7).

Em conclusão, o número de bactérias viáveis à temperatura de refrigeração diminuiu ligeiramente ao fim de 24 horas para algumas estirpes, mas no geral manteve-se constante ao longo do tempo com exceção da estirpe EGDe onde se verificou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do número de bactérias viáveis ao fim de 7 dias. Estes resultados estão de acordo com resultados obtidos em estudos anteriores em que, o armazenamento à temperatura de refrigeração, na ausência de nutrientes, não revelou diferenças significativas no número de bactérias viáveis (Buncic & Avery, 1996; Avery & Buncic, 1997).

Estudos anteriores referem a existência de uma quarta fase do ciclo de crescimento bacteriano, incluindo o de *L. monocytogenes*, chamada de fase LTS (*Long-Term Survival phase*). Esta fase é caracterizada por fenómenos de morte celular programada em que, quando a concentração da população bacteriana é demasiado elevada para os nutrientes disponíveis, parte da população entra em apoptose, libertando nutrientes para o meio através da lise celular. Sabe-se que as células lisadas exibem sinais que permitem à população sobrevivente escapar à apoptose e alimentar-se dos nutrientes por elas libertados. Este fenómeno é conhecido como crescimento críptico (Wen *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2013). Este crescimento críptico poderá ser uma forma de justificar a ausência de diferenças significativas na viabilidade dos isolados e até o aumento do número de células viáveis na

estirpe de referência EGDe ao fim de 7 dias, sem nutrientes, a 7 °C mas mais estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

A adaptação de *L. monocytogenes* ao frio pode estar relacionada com o fator alternativo  $\sigma^B$ . Como já foi referido anteriormente,  $\sigma^B$  é estimulado em resposta a abaixamentos de temperatura. Mutantes sem este fator perdem a capacidade de acumular os solutos compatíveis como a betaína e carnitina, que são muito importantes na adaptação a baixas temperaturas (Becker *et al.*, 2000).

OppA, uma lipoproteína ligada à superfície da célula que proteína participa na absorção de nutrientes, reciclagem de péptidos da parede celular, entre outros, parece ser muito importante para a adaptação a baixas temperaturas em *L. monocytogenes* (revisto por Cabrita *et al.*, 2014).

À temperatura de 37 °C, apenas os isolados 3077, 3172 e 3049 não sofreram redução do número de bactérias viáveis ao fim de 1 dia ( $p > 0,05$ ). Todos os isolados sofreram uma diminuição significativa do número de bactérias viáveis ao fim de 7 dias ( $p < 0,05$ ). (Figura 7)

A 37 °C sem nutrientes, existe uma diminuição muito acentuada no número de bactérias viáveis que, dependendo da estirpe, varia entre 2 e 4 log menos bactérias viáveis ao fim de 7 dias. Este abaixamento do número de bactérias viáveis pode fazer parte da justificação das dificuldades encontradas na determinação do potencial virulento para alguns isolados (3993, 3046 e 3049), após 7 dias a 37 °C. Possivelmente, o número de bactérias sobreviventes ao fim deste tempo, para estas estirpes, não foi o suficiente para haver formação de placas de lise de acordo com o protocolo de PFA utilizado.

Com estes resultados não foi possível concluir que as temperaturas de refrigeração, *per se*, sejam suficientes para baixar a virulência de *L. monocytogenes*, uma vez que à temperatura ótima de crescimento deste patogénico, também se verificou uma diminuição do potencial virulento. Uma vez que nos ensaios de virulência o tempo de exposição foi, para todos os isolados, um fator altamente significativo ( $p < 0,01$ ) (Tabela 5), estes resultados sugerem que a



ausência de nutrientes possa ter mais influência que o efeito da temperatura de refrigeração na virulência de *L. monocytogenes*. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar os efeitos da falta de nutrientes na virulência desta bactéria, por exemplo, ensaios semelhantes aos realizados neste estudo mas que incluam um controle em que os isolados sejam armazenados nas mesmas condições mas na presença de nutrientes.

## 4. Conclusões

*Listeria monocytogenes* é um patógeno de origem alimentar responsável por graves surtos de listeriose, uma infecção grave com uma taxa de mortalidade que pode atingir os 30%, particularmente em indivíduos imunocomprometidos. *L. monocytogenes* é difícil de controlar devido à sua ocorrência ubíqua, sendo também encontrada em ambientes de manipulação de alimentos, permitindo facilmente a contaminação dos produtos alimentares transformados. Além disso, esta bactéria é muito versátil, o que facilita a resistência a ambientes de stresse que podem ser impostos através de medidas de conservação de alimentos e de controlo de higiene (Gandhi & Chikindas, 2007). Em particular, os principais problemas de controlo são devidos ao seu carácter psicrófilo que permite a proliferação deste patógeno em produtos alimentares RTE conservados a temperaturas de refrigeração (Michel *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi avaliada a virulência de 10 isolados, em soro fisiológico tamponado e portanto na ausência de crescimento, antes e após 1 e 7 dias de exposição às temperaturas de 7 °C e de 37 °C. Os resultados aqui apresentados mostraram um abaixamento generalizado da virulência, em ambas as temperaturas de armazenamento. Os alimentos RTE estão entre os principais alimentos de risco para *L. monocytogenes* uma vez que não estão sujeitos a nenhum tratamento, como por exemplo a confeção, que elimine a presença do patógeno (Leong *et al.*, 2014). Apesar de existirem alimentos RTE que não permitem o crescimento de *L. monocytogenes*, se houver contaminação do produto acabado, a bactéria pode manter-se em concentrações elevadas durante dias, mesmo a temperaturas de refrigeração.

Embora a refrigeração de alimentos seja um processo cada vez mais utilizado pela Indústria Alimentar, existem poucos estudos relativos ao efeito das temperaturas de refrigeração sobre a virulência de *L. monocytogenes*. Os resultados aqui obtidos sugerem que o facto de o alimento poder permitir, ou não, o crescimento deste patógeno alimentar, poderá ser também relevante em termos do potencial patogénico de *Listeria* presente nos alimentos. Em termos de avaliação do risco representado pela presença de *L. monocytogenes* em

alimentos sujeitos ao frio, os resultados aqui apresentados corroboram o fato de que os alimentos que sustentam o crescimento deste patogénio devem constituir o principal objetivo da gestão de risco associado à presença desta bactéria patogénica nos alimentos.

## 5. Bibliografia

Abram, F., Su, W.L., Wiedmann, M., Boor, K.J., Coote, P., Botting, C., Karatzas, K.A. & O'Byrne, C.P. (2008) Proteomic analyses of a *Listeria monocytogenes* mutant lacking sigmaB identify new components of the sigmaB regulon and highlight a role for sigmaB in the utilization of glycerol. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 594-604.

Al-Zeyara, S.A., Jarvis, B. & Mackey, B.M. (2011) The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* **145**: 98-105.

Angelidis, A.S. & Smith, G.M. (2003) Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes* to chill stress in defined medium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 7492-7498.

Avery, S.M. & Buncic, S. (1997) Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37 degrees C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. *International Journal of Food Microbiology* **34**: 319-327.

Beales, N. (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **3**: 1-20.

Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W. & Benson, A.K. (2000) Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *Journal of Bacteriology* **182**: 7083-7087.

Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M.R., Haug, M.C., Lawson, P.A., Lacroix, C. & Meile, L. (2013) *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 526-532.

Brackett, R.E. & Beuchat, L.R. (1990) Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* grown on crabmeat. *Applied and Environmental Microbiology* **56**: 1216-1220.

Buncic, S. & Avery, S.M. (1996) Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37 degrees C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. *Letters in Applied Microbiology* **23**: 18-22.

Buncic, S., Avery, S.M. & Rogers, A.R. (1996) Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature. *International Journal of Food Microbiology* **31**: 133-147.

Buncic, S., Avery, S. M., Rocourt, J., Dimitrijevic, M. (2001) Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology* **65**: 201-212.

Cabrita, P., Correia, S., Ferreira-Dias, S. e Brito, L. (2004) Genetic characterization of *Listeria monocytogenes* food isolates and pathogenic potential within serovars 1/2a and 1/2b. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 454-461.

Cabrita, P., Trigo, M. J., Ferreira, R. B., e Brito, L. (2014) Is the Exoproteome Important for Bacterial Pathogenesis? Lessons Learned from Interstrain Exoprotein Diversity in *Listeria monocytogenes* Grown at Different Temperatures. *OMICS A Journal of Integrative Biology* **18(9)**: 553-569.

Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitao, E., Sousa, S. & Cabanes, D. (2011) The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* **2**: 379-394.

Chaturongakul, S. & Boor, K.J. (2004) RsbT and RsbV contribute to sigmaB-dependent survival under environmental, energy, and intracellular stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5349-5356.

Cheng, L.W., Viala, J.P., Stuurman, N., Wiedemann, U., Vale, R.D. & Portnoy, D.A. (2005) Use of RNA interference in *Drosophila* S2 cells to identify host pathways controlling compartmentalization of an intracellular pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 13646-13651.

Commission Regulation (EC) (22-12-2005) No 2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. *Official Journal of the European Union* **L 338/1**: 1-26

Cummins, A.J., Fielding, A.K. & McLauchlin, J. (1994) *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *The Journal of Infection* **28**: 89-91.

Czuprynski, C.J., Brown, J.F. & Roll, J.T. (1989) Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *Microbial Pathogenesis* **7**: 213-223.

de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K. & Vazquez-Boland, J.A. (2011) Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology* **14**: 118-127.

den Bakker, H.C., Warchocki, S., Wright, E.M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D., Wiedmann, M.. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 1882-1889.

Disson, O. & Lecuit, M. (2013) *In vitro* and *in vivo* models to study human listeriosis: mind the gap. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* **15**: 971-980.

Duodu, S., Holst-Jensen, A., Skjerdal, T., Cappelier, J.M., Pilet, M.F. & Loncarevic, S. (2010) Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. *Food Microbiology* **27**: 795-801.

Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews* **55**: 476-511.

Ferreira, A., O'Byrne, C.P. & Boor, K.J. (2001) Role of sigma(B) in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4454-4457.

Gaillard, J.L., Berche, P. & Sansonetti, P. (1986) Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* **52**: 50-55.

Galdiero, E., D'Isanto, M. & Aliberti, F. (1997) Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. *Research Microbiology* **148**: 305-313.

Gandhi M & Chikindas ML (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113**: 1-15.

Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G. & Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* **68**: 999-1003.

Goldfine, H. & Shen, H. (2007) *Listeria monocytogenes: pathogenesis and host response*. Springer, New York.

Goldfine, H., Bannam, T., Johnston, N.C. & Zuckert, W.R. (1998) Bacterial phospholipases and intracellular growth: the two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes*. *Symposium Series* **27**: 7S-14S.

Graves, L.M., Hessel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, H. C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Saunders, B. D. (2010) *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 1280-1288.

Gray, M.J., Freitag, N.E. & Boor, K.J. (2006) How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Immunity* **74**: 2505-2512.

Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechai, F., Mamzer-Bruneel, M. F., Bielecka, M. K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., Lecuit, M. (2010) Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases* **16**: 136-138.

Gyles, C.L. (2010) *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa.



Henry, R., Shaughnessy, L., Loessner, M.J., Alberti-Segui, C., Higgins, D.E. & Swanson, J.A. (2006) Cytolysin-dependent delay of vacuole maturation in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology* **8**: 107-119.

Hof, H. (1984) Virulence of Different Strains of *Listeria-Monocytogenes* Serovar 1/2a. *Medical Microbiology and Immunology* **173**: 207-218.

Hof, H., Ulbricht, A. & Stehle, G. (1992) Listeriosis--a puzzling disease. *Infection* **20**: 290-292.

Humann, J., Bjordahl, R., Andreasen, K. & Lenz, L.L. (2007) Expression of the p60 autolysin enhances NK cell activation and is required for *Listeria monocytogenes* expansion in IFN-gamma-responsive mice. *Journal of Immunology* **178**: 2407-2414.

Kazmierczak, M.J., Wiedmann, M. & Boor, K.J. (2006) Contributions of *Listeria monocytogenes* sigmaB and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth. *Microbiology* **152**: 1827-1838.

Lambertz, S.T., Nilsson, C., Bradenmark, A., Sylven, S., Johansson, A., Jansson, L.M. & Lindblad, M. (2012) Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *International Journal of Food Microbiology* **160**: 24-31.

Lang, Halter, E., Neuhaus, K. & Scherer, S. (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 641-647.

Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P. A., Le Fleche-Mateos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F. (2010) *Listeria rocourtiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2210-2214.

Lecuit, M. (2007) Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* **9**: 1216-1225.

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

Leong, D., Alvarez-Ordóñez, A. e Jordan, K. (2014) Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. *Frontiers in Microbiology*. **5**: 436.

Lessing, M.P., Curtis, G.D. & Bowler, I.C. (1994) *Listeria ivanovii* infection. *The Journal of Infection* **29**: 230-231.

Liu, D. (2006) Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *Journal of Medical Microbiology* **55**: 645-659.

Liu, D. (2008) *Handbook of Listeria monocytogenes*. Taylor & Francis, Boca Raton.

Liu, D., Lawrence, M.L., Gorski, L., Mandrell, R.E., Ainsworth, A.J. & Austin, F.W. (2006) *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains belonging to lineages I and III possess distinct molecular features. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 214-217.

Liu, S., Graham, J.E., Bigelow, L., Morse, P.D., & Wilkinson, B.J. (2002) Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1697-1705.

Mandin, P., Fsihi, H., Dussurget, O., Vergassola, M., Milohanic, E., Toledo-Arana, A., Lasa, I., Johansson, J. & Cossart, P. (2005) VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Molecular Microbiology* **57**: 1367-1380.

McLauchlin, J. (1990) Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases : Official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **9**: 210-213.

Michel, E., Stephan, R. & Tasara, T. (2011) The *Imo0501* gene coding for a putative transcription activator protein in *Listeria monocytogenes* promotes growth under cold, osmotic and acid stress conditions. *Food Microbiology* **28**: 1261-1265.

Miladi, H., Bakhrouf, A. & Ammar, E. (2013) Cellular lipid fatty acid profiles of reference and food isolates *Listeria monocytogenes* as a response to refrigeration and freezing stress. *Journal of Food Biochemistry* **37**: 136-143.

Myers, E.R. & Martin, S.E. (1994) Virulence of *Listeria monocytogenes* propagated in NaCl containing media at 4-Degrees, 25-Degrees and 37-Degrees. *Journal of Food Protection* **57**: 475-478.

NEVES, Elsa Maria da Conceição Agostinho - **Tipagem molecular e avaliação do potencial patogénico de *Listeria monocytogenes***. Lisboa: E. Neves, 2009. Tese de doutoramento em Engenharia Agro-Industrial, apresentada ao Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa sob orientação de Maria Luísa Lopes de Castro e Brito.

Olier, M., Pierre, F., Lemaitre, J.P., Divies, C., Rousset, A. & Guzzo, J. (2002) Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. *Microbiology* **148**: 1855-1862.

Oliver, H.F., Orsi, R.H., Wiedmann, M. & Boor, K.J. (2010) *Listeria monocytogenes* {sigma}B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4216-4232.

Orsi, R.H., den Bakker, H.C. & Wiedmann, M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*: **301**: 79-96.

Piffaretti, J.C., Kressebuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. & Rocourt, J. (1989) Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 3818-3822.

Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J.D. & Weaver, R.E. (1991) Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **29**: 990-996.

Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2006) Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Pathology* **208**: 215-223.

Portnoy, D.A., Auerbuch, V. & Glomski, I.J. (2002) The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *The Journal of Cell Biology* **158**: 409-414.

Pricope-Ciolacu, L., Nicolau, A.I., Wagner, M. & Rychli, K. (2013) The effect of milk components and storage conditions on the virulence of *Listeria monocytogenes* as determined by a Caco-2 cell assay. *International Journal of Food Microbiology* **166**: 59-64.

Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P. & Vijila, H.M. (2007) *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* **40**: 4-13.

Rasmussen, O.F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L. & Olsen, J.E. (1995) *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* **141(9)**: 2053-2061.

Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J.M. & Wiedmann, M. (2006) Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* **152**: 685-693.

Roche, S.M., Velge, P., Bottreau, E., Durier, C., Marquet-van der Mee, N. & Pardon, P. (2001) Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *International Journal of Food Microbiology* **68**: 33-44.

Roche, S.M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Temoin, S., Grepinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P., Velge, P. (2005) Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 6039-6048.

Rocourt, J. & Bille, J. (1997) Foodborne listeriosis. *World health statistics quarterly Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales* **50**: 67-73.

Ryser, E.T. & Marth, E.H. (2007) *Listeria, listeriosis, and food safety*. CRC Press, Boca Raton.

Shaughnessy, L.M., Hoppe, A.D., Christensen, K.A. & Swanson, J.A. (2006) Membrane perforations inhibit lysosome fusion by altering pH and calcium in *Listeria monocytogenes* vacuoles. *Cellular Microbiology* **8**: 781-792.

Shen, J., Rump, L., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, X. & Meng, J. (2013) Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiology* **35**: 58-64.

Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. & Ireton, K. (2000) InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**: 501-510.

Sleator, R.D., Gahan, C.G. & Hill, C. (2003) A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 1-9.

Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A. & Goldfine, H. (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity* **63**: 4231-4237.

Stephens, J.C., Roberts, I.S., Jones, D. & Andrew, P.W. (1991) Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. *The Journal of Applied Bacteriology* **70**: 239-244.

Tran, H.L. & Kathariou, S. (2002) Restriction fragment length polymorphisms detected with novel DNA probes differentiate among diverse lineages of serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and identify four distinct lineages in serotype 4b. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 59-64.

Vazquez-Boland, J.A., Dominguez-Bernal, G., Gonzalez-Zorn, B., Kreft, J. & Goebel, W. (2001) Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection/Institut Pasteur* **3**: 571-584.

Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology reviews* **14**: 584-640.

Vera, A., Gonzalez, G., Dominguez, M. & Bello, H. (2013) Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena de Infectologia: organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia* **30**: 407-416.

Wadsworth, S.J. & Goldfine, H. (2002) Mobilization of protein kinase C in macrophages induced by *Listeria monocytogenes* affects its internalization and escape from the phagosome. *Infection and Immunity* **70**: 4650-4660.

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

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Sleator, R.D., Wouters, J.A., Hill, C. & Abee, T. (2004) Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth

of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2912-2918.

Wemekamp-Kamphuis, H.H., Wouters, J.A., de Leeuw, P.P., Hain, T., Chakraborty, T. & Abee, T. (2004) Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 3457-3466.

Wen, J., Anantheswaran, R.C. & Knabel, S.J. (2009) Changes in barotolerance, thermotolerance, and cellular morphology throughout the life cycle of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1581-1588.

Wen, J., Karthikeyan, S., Hawkins, J., Anantheswaran, R.C. & Knabel, S.J. (2013) *Listeria monocytogenes* responds to cell density as it transitions to the long-term-survival phase. *International Journal of Food Microbiology* **165**: 326-331.

Wen, J., Deng, X., Li, Z., Dudley, E.G., Anantheswaran, R.C., Knabel, S.J. & Zhang, W. (2011) Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the long-term-survival phase. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 5966-5972.

Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J. & Boor, K.J. (1998) General stress transcription factor sigmaB and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* **180**: 3650-3656.

Wuenschel, M.D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U. & Goebel, W. (1993) The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology* **175**: 3491-3501.



Zweibaum, A., Pinto, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Triadou, N., Lacroix, B., Haffen, K., Brun, J.L. & Rousset, M. (1985) Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of Cellular Physiology* **122**: 21-29.