UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrintestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas

Lizziane Kretli Winkelströter

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e
adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em
diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em
alimentos e em presença de bacteriocinas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Lizziane Kretli Winkelströter
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Versão corrigida da Tese de Doutorado o apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 10/12/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Winkelströter, Lizziane Kretli

Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas. Ribeirão Preto, 2012.

91p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: De Martinis, Elaine C. Pereira.

1. *Listeria monocytogenes* 2. Biofilmes 3. Células Caco-2
4. Bacteriocinas 5. Expressão gênica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lizziane Kretli Winkelströter

Título do trabalho: Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Wilson e Luciene e minhas irmãs, Larissa e Lorena,
meu porto seguro e amor incondicional.*

*Ao Rodrigo por todo suporte afetivo e por
sempre acreditar em mim.*

Agradecimentos

A Deus por sempre me iluminar e me guiar.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela confiança e por todos os ensinamentos compartilhados ao longo destes anos de trabalho.

I would like to express my gratitude to my supervisor, Dr. Atin Datta, whose expertise, understanding and patience, added considerably to my graduate experience and scientific maturing. Thanks especially for the experience with modern molecular biology and genetic techniques applied to *Listeria monocytogenes* research, which was invaluable for concluding the Ph.D. thesis when of my return to Brazil.

I thank my labmates from Food and Drug Administration (FDA), Laurel, MD/EUA: Laurel, Pongpan, Alex and Luouth for their sincere friendship and for providing a stimulating and fun environment in which I could learn and grow. I also would like to thank everyone from Mod1 building which made my stay more pleasant.

Aos meus pais, Wilson e Luciene, que me deram não somente a vida, mas principalmente a minha educação e condições de estudo.

Às minhas irmãs Larissa e Lorena por sempre torcerem por mim.

Ao Rodrigo, pelo amor e compreensão nos momentos difíceis, e por todo apoio na superação de meus desafios.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram: avós, tios, primos e meu afilhado.

Às minhas amigas Elisa, Farah e Lidiane pelos momentos de alegria que passamos juntas.

Aos amigos: Roberto, Pedro, Stella, Fábio, Priscila, Aline, Talita, Renata, Lílian pelo carinho.

À Profa. Dra. Sandra Veiga por acreditar em mim e proporcionar a primeira oportunidade de trabalhar com Microbiologia de Alimentos na UNIFAL-MG.

Aos colegas de laboratório, Eliane, Juliana, Marina, Bruna, Fabrício, Fernanda, Carine, Otávio, Paula, Cida e a técnica Vanessa pela agradável convivência.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo pela colaboração nos experimentos com culturas de células.

Ao Dr. Ernesto Hoffer por ter fornecido alguns isolados de *L. monocytogenes* de origem clínica.

À Profa. Dra. Maria Tereza Destro por ceder *L. monocytogenes* de origem de alimentos e ambiente de processamento de alimentos.

À Técnica da FMRP-USP Lilian Eslaine Costa Mendes da Silva, pelas sugestões e constante disposição em ajudar nas análises da expressão gênica.

À Maria Aparecida e Terezinha funcionárias da segurança do Bloco R, por serem sempre prestativas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, seus funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 2008/58300-1) e pelo suporte financeiro deste projeto (Processo nº 2009/51141-8).

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche (bolsa CAPES PDEE-BEX 3589-10-2).

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação (PRPG) da Universidade de São Paulo pelo auxílio financeiro concedido para a participação de eventos científicos.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser... mas Graças a Deus, não somos o que éramos.”

Martin Luther King

RESUMO

WINKELSTRÖTER, L.K. **Análise da expressão gênica, formação de biofilmes e adesão/invasão a célula Caco-2 por *Listeria monocytogenes* em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas.** 2012. 91f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Listeria monocytogenes é uma bactéria transmitida principalmente via alimentos, podendo causar infecções graves em pessoas imunodeprimidas e durante a gestação, devido à sua capacidade de sobreviver intracelularmente. A formação de biofilmes por *L. monocytogenes* é um fator preocupante para as indústrias de alimentos, pois biofilmes comprometem a sanitização de superfícies, aumentando os riscos de contaminação. Além disso, alguns estudos indicam que a capacidade de formação de biofilme pode estar correlacionada com a capacidade de algumas bactérias causarem doença. O controle de *L. monocytogenes* representa um desafio, especialmente em alimentos refrigerados e prontos para o consumo, pois esta bactéria é de natureza psicotrófica, ubíqua e adapta-se rapidamente a diferentes condições ambientais, por meio da modulação da expressão de seus genes. O efeito das condições ambientais na expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* não é totalmente compreendido. Neste trabalho, isolados de *L. monocytogenes* de diversas origens foram avaliados quanto à sua capacidade de formar biofilmes, de aderir/invadir em células eucarióticas e também de expressar o gene internalina (*int A*), que está relacionado com o potencial de virulência. A presença de bacteriocinas de bactérias lácticas (BAL) e incubação a 5°C foram os principais fatores que influenciaram a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*, em comparação com caldo BHI (controle). Em geral, a adesão/invasão de células Caco-2 foram significativamente menores em pH baixo (4,5), incubação a 5°C e na presença de 0,3% Oxgall (sais biliares). Entretanto, dois isolados de *L. monocytogenes* (INCQS 353 e Reg 26c) apresentaram aumento nas taxas de invasão quando cultivados na presença de NaCl a 5% ($P < 0,05$). Um isolado de *L. monocytogenes* (H-2) obtido de hortaliças apresentou a maior capacidade de formação de biofilme e de invadir células Caco-2, sugerindo que há uma possível relação entre a formação de biofilme e de potencial de virulência. No ensaio para avaliação da expressão do gene *inIA*, todos os isolados foram regulados negativamente pela presença de bacteriocinas, Oxgall 0,3%, pH 4,5 e incubação a 5°C. No entanto, para um isolado de *L. monocytogenes* (HU 471), a expressão do gene *int A* foi oito vezes maior na presença de sacarose, indicando que os componentes de alimentos podem aumentar a virulência e o potencial de infecção de *L. monocytogenes*.

Palavras-chaves: *L. monocytogenes*, biofilmes, células Caco-2, bacteriocina, expressão gênica.

ABSTRACT

WINKELSTRÖTER, L.K. **Analysis of gene expression, biofilm formation and adhesion/invasion to Caco-2 cell by *Listeria monocytogenes* in different conditions found in the gastrointestinal tract, in food and in the presence of bacteriocins.** 2012. 91f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Listeria monocytogenes is a bacterium transmitted mainly by foods and can cause serious infections in immunocompromised individuals and in pregnant woman due to their ability to survive intracellularly. The biofilm formation by *L. monocytogenes* is a concern for the food industry because microorganism in biofilms may survive after treatment with sanitizers and increases the risk of food contamination. In addition, some studies indicate that the ability of biofilm formation can be correlated with virulence potential. The control of *L. monocytogenes* is a challenge, especially in chilled and ready to eat foods since it has psychrotrophic nature, it is ubiquitous and can adapt quickly to different environmental conditions by modulating the expression of its genes. The effect of environmental conditions on gene expression and virulence of *Listeria monocytogenes* is not fully understood. In this report, *L. monocytogenes* isolates from diverse sources were evaluated for their ability to form biofilms, for adhesion/invasion of eukaryotic cells and also for differential expression of internalin A gene (*int A*), which is related to virulence potential. The presence of bacteriocins of lactic acid bacteria (BAL) and incubation at 5°C were the main factors that influenced biofilm formation by *L. monocytogenes*, in comparison with BHI broth (control). In general, adhesion and invasion of Caco-2 cells were significantly lower in low pH (4.5), incubation at 5°C and in presence of Oxgall 0.3% (bile salts). On the other hand, two *L. monocytogenes* isolates (INCQS 353 and Reg 26c) showed higher invasion rates when cultivated in the presence of NaCl 5% ($P < 0.05$). One *L. monocytogenes* (H-2) isolated from minimally processed leafy vegetables showed the strongest ability to form biofilm and to invade Caco-2 cells, under selected conditions, suggesting there may be a relationship between biofilm formation and virulence potential. For the vast majority of isolates, expression of *int A* gene were down regulated by the presence of bacteriocins, Oxgall 0.3%, pH4.5 and incubation at 5°C. Nonetheless, for one *L. monocytogenes* isolate (HU 471) expression of *int A* gene was eight times higher in presence of sucrose, indicating that food components can increase the infectiveness of *L. monocytogenes*.

Key words: *L. monocytogenes*, biofilms, Caco-2 cells, bacteriocin, gene expression

RESUMEN

WINKELSTRÖTER, L.K. **Análisis de la expresión génica, la formación de biopelículas y la adhesión / invasión de células caco-2 por *Listeria monocytogenes* en diferentes condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal, en los alimentos y en la presencia de bacteriocinas.** 2012. 91f. Tesis (doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Listeria monocytogenes es una bacteria que se transmite principalmente por alimentos y puede causar infecciones graves en inmunodeprimidos y personas en la mujer embarazada debido a intracelular su capacidad para sobrevivir. La formación de biopelículas de *L. monocytogenes* es una preocupación para la industria alimentaria porque biofilms cometido el aumento de superficie poder desinfectante y el riesgo de contaminación. Además, algunos estudios indican que la capacidad de formación de biofilm se puede correlacionar con algunas enfermedades causadas por bacterias. El control de *L. monocytogenes* es un reto, especialmente en refrigerados y alimentos listos para comer, ya que tiene carácter psicrotófos, es ubicua y rápidamente se adapta a diferentes condiciones ambientales mediante la modulación de la expresión de su efecto genes. The de las condiciones ambientales sobre la expresión génica y la virulencia de *L. monocytogenes* no se entiende completamente. En este informe, *L. monocytogenes* aislamientos procedentes de fuentes diversas fueron evaluados por su capacidad de formar biofilms, por adhesión/invasión de las células eucariotas y la expresión diferencial de internalina también de un gen (*int A*), que está relacionada con el potencial virulencia. La presencia de las bacteriocinas de bacterias láctica (BAL) y la incubación a 5°C fueron los factores que más influyen en la formación de biopelículas que *L. monocytogenes*, en comparación con BHI caldo (control). En general, la adherencia y la invasión de células Caco-2 fueron significativamente más bajos en pH bajo (4,5), la incubación a 5°C y en presencia de 0,3% Oxgall. Por otra parte, dos aislamientos *L. monocytogenes* (INCQS 353 y Reg 26c) mostraron mayores tasas de invasión cuando se cultivan en presencia de NaCl al 5% ($p < 0,05$). Uno *L. monocytogenes* aislar (H-2) mostró la más fuerte capacidad de formar biopelículas y para invadir células Caco-2, en condiciones seleccionadas, lo que sugiere que pode existir una relación entre la formación de biofilm y potencial de virulencia. Para todas las cepas, la expresión del gen *int A* descenso regulado por la presencia de bacteriocinas, Oxgall 0,3%, pH 4,5 y la incubación a 5°C. No obstante, para una *L. monocytogenes* aislada (HU 471) la expresión del gen *int A* fue ocho veces mayor en presencia de sacarosa, lo que indica que los componentes de los alimentos pueden aumentar potencia infecciosidad de *L. monocytogenes*.

Palabras clave: *L. monocytogenes*, biopelículas, las células caco-2, la bacteriocina, la expresión génica

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (Fonte: CRUZ et al., 2008)..... 6
- Figura 2.** Representação esquemática das etapas de formação do biofilme: 1) adesão inicial das células bacterianas na superfície, 2) EPS é produzido e adesão se torna irreversível, 3 e 4) a arquitetura do biofilme se desenvolve e amadurece e 5) as células individuais são dispersas do biofilme (Fonte: MONROE, 2007). 11
- Figura 3.** Perfis de adesão dos isolados de *L. monocytogenes* por meio da quantificação espectrofotométrica (595nm) do corante cristal violeta associado às células bacterianas aderidas a placa de microtitulação quando cultivadas: **A)** caldo BHI por 24h/37°C, **B)** caldo BHI suplementado com cloreto de sódio 5% por 24h/37°C, **C)** caldo BHI suplementado com sacarose 2% por 24h/37°C, **D)** caldo BHI suplementado com Oxgall 0,3% por 24h/37°C, **E)** caldo BHI suplementado com ácido clorídrico (pH 4,5) por 24h/37°C, **F)** caldo BHI por 72h/5°C, **G)** caldo BHI suplementado com extrato semi-purificado obtido da cultura de *E. faecium* 130 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C, **H)** em caldo BHI suplementado com o extrato semi-purificado da cultura de *L. mesenteroides* 11 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C, **I)** em caldo BHI suplementado com extrato semi-purificado de cultura de *L. sakei* 1 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C..... 35
- Figura 4.** Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *L. sakei* 1 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul 42
- Figura 5.** Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *L. mesenteroides* A11 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul..... 42
- Figura 6.** Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *E. faecium* 130 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul 42
- Figura 7.** Fotomicrografia de gel de agarose em tampão TBE prepadado com água DEPC demonstrando a qualidade do RNA extraído de *L. monocytogenes* tratadas por uma hora com extrato semi-purificado da cultura de *L. sakei* 1 produtor de bacteriocina: M) marcador de 1kb 1) L.m. ATCC 19115, 2) L.m. HU 533 3) L.m. HU 471 4) L.m. Vi-1 5) L.m. H-2 6) L.m. FCF/SP 11, 7) L.m. FCF/SP 4, 8) L.m. Reg. 26c, 9) L.m. INCQS 327, 10) L.m. INCQS 353. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas na figura..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Isolados de <i>L. monocytogenes</i> estudados no presente trabalho, sua origem e sua fonte de isolamento.....	21
Tabela 2.	Condições usadas para a avaliação dos efeitos dos diferentes fatores de estresse na formação de biofilme, na adesão/invasão de células Caco-2 e na expressão de gene internalina por isolados de <i>L. Monocytogenes</i>	23
Tabela 3.	Sondas fluorescentes para hibridação <i>in situ</i> por fluorescência	28
Tabela 4.	Especificações dos <i>primers</i> utilizados para avaliação da expressão gênica em <i>L. monocytogenes</i>	30
Tabela 5.	Porcentagens de adesão em células Caco-2 por isolados de <i>L. monocytogenes</i> quando cultivadas em: caldo BHI, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (<i>E. faecium</i> 130, <i>L. mesenteroides</i> A 11 e <i>L. sakei</i> 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI incubados a 5°C/72h.....	38
Tabela 6.	Porcentagens de invasão em células Caco-2 por isolados de <i>L. monocytogenes</i> quando cultivadas em: caldo BHI, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (<i>E. faecium</i> 130, <i>L. mesenteroides</i> A 11 e <i>L. sakei</i> 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI incubados a 5°C/72h.....	39
Tabela 7.	Porcentagens de adesão em células Caco-2 por isolados de <i>L. monocytogenes</i> quando cultivadas em co-cultura com <i>L. sakei</i> 1, <i>L. mesenteroides</i> A11 e <i>E. faecium</i> 130	40
Tabela 8.	Porcentagens de invasão em células Caco-2 por isolados de <i>L. monocytogenes</i> quando cultivadas em co-cultura com <i>L. sakei</i> 1, <i>L. mesenteroides</i> A11 e <i>E. faecium</i> 130	41
Tabela 9.	Valores de ΔC_t utilizados para avaliação da expressão gênica de <i>inlA</i> em <i>L. monocytogenes</i> quando incubados em caldo BHI suplementado com: NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), caldo BHI 5°C, extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>L. sakei</i> 1, extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>L. mesenteroides</i> A11 e extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>E. faecium</i> 130	45

Tabela 10.	Porcentagem do nível de expressão do gene <i>inlA</i> em caldo BHI suplementado com: NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), caldo BHI 5°C, extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>L. sakei</i> 1, extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>L.mesenteroides</i> A11 e extratos semi-purificado obtidos da cultura de <i>E. faecium</i> 130	46
-------------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

Bac+: Cepa produtora de bacteriocina

BAL: Bactérias láticas

BHI: Caldo Infusão Cérebro Coração

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças – EUA, do inglês “*Centers for Diseases Control and Prevention*”

cDNA: DNA complementar, do inglês “complementary DNA”

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CO₂: Gás carbônico

Ct: Ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção, do inglês “*cycle threshold*”

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DEPC: Dietil pirocarbonato do inglês “Diethyl pyrocarbonate”

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DO: Densidade ótica

DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos

EPEC: *E. coli* enteropatogênica

ETEC: *E. coli* enterotoxigênica

eDNA: DNA extracelular

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “*Ethylenediamine tetraacetic acid*”

EF: *Enterococcus faecium*

EPS: Exopolissacarídeos

EUA: Estados Unidos da América

FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

FISH: Hibridação *in situ* por fluorescência

HCl: ácido clorídrico

HCPA: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HU: Hospital Universitário

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC/FIOCRUZ: Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz

ISDF: Instituto de Saúde do Distrito Federal

QR: Nível expressão gênica

Lmc: *Leuconostoc mesenteroides*

Rev: Reverse primer

Fwd: Forward primer

Ls: *Lactobacillus sakei*

MRS: de Man, Rogosa Sharpe

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”

PBS: Solução Salina Fosfatada Tamponada, do inglês “*Phosphate buffered saline*”

PFGE: Eletroforese em gel de campo pulsado, do inglês “*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*”

qRT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real, do inglês “*Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*”

RNA: Ácido ribonucleico, do inglês, “*Ribonucleic acid*”

SVS: Secretaria de Vigilância em Saúde

SHU: Síndrome hemolítico-urêmica

TBE: Solução tampão Tris/Borato/EDTA

TGI: trato gastrointestinal

T_m : Temperatura de fusão do *amplicon*, do inglês “*melting temperature*”

TSA-YE: Ágar soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UK: Reino Unido

WHO: Organização Mundial de Saúde, do inglês “*World Health Organization*”

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem
% (v/v): Porcentagem volume por volume
% (p/v): Porcentagem peso por volume
°C: Grau Celsius
kDa: kilodaltons
Kb: kilopares de base
H: hora
mL: Mililitros
min.: Minutos
nm: Nanômetros
M: Molar
rpm: Rotações por minuto
µm: Micrometros
mol/L: Mol por litro
mM: Milimolar
µg/mL: Microgramas por mL
g: grama
g: Gravidade
µL: Microlitro
ng: Nanograma
ng/µL: Nanograma por microlitro
µM: Micromolar
UA/mL: Unidades arbitrárias por mililitro
UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
RESUMEN	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.2. Patogenicidade.....	5
1.3. Biofilmes.....	10
1.4. Probióticos.....	13
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivos gerais.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Culturas bacterianas	20
3.2. Estudos com bacteriocinas semi-purificadas.....	21
3.3. Estudos em condições que mimetizam o trato gastrointestinal e alimentos.....	22
3.4. Avaliação da formação de biofilmes	23
3.5. Ensaio de adesão e invasão por <i>L. monocytogenes</i> em células Caco-2	24
3.5.1. Cultura de células Caco-2	24
3.5.2. Ensaio de adesão de <i>L. monocytogenes</i> em células Caco-2	25
3.5.3 Ensaio de invasão de <i>L. monocytogenes</i> em células Caco-2	25
3.5.4. Ensaio de adesão e invasão em células Caco-2 com co-cultura de <i>L. monocytogenes</i> e bactérias lácticas	26
3.5.4.1. Hibridação <i>in situ</i> por fluorescência para ensaio da adesão <i>L. monocytogenes</i> às células Caco-2 em co-cultivo com bactérias lácticas	27
3.6. Avaliação da expressão do gene <i>InlA</i> em isolados de <i>L. monocytogenes</i> quando submetidos a condições que mimetizam o trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas	28
3.7. Análise estatística	31

4. RESULTADOS.....	33
4.1. Avaliação da formação de biofilmes em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal e alimentos.....	33
4.2. Avaliação da capacidade de invasão e adesão de células Caco-2 por <i>L. monocytogenes</i> em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos e em presença de preparações semi-purificadas contendo bacteriocinas	36
4.3. Avaliação da capacidade de invasão e adesão de células Caco-2 por <i>L. monocytogenes</i> em co-cultura com bactérias lácticas	40
4.4. Avaliação da expressão do gene <i>InlA</i> de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas por meio da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).....	43
5. DISCUSSÃO	48
5.1. Formação de biofilmes em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal e alimentos.....	48
5.2. Invasão e adesão de células Caco-2 por <i>L. monocytogenes</i> em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos, em de preparações contendo bacteriocinas e em co-cultivo com bactérias ácidas lácticas.....	50
5.3. Expressão do gene <i>InlA</i> de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos e em preparações contendo bacteriocinas	56
6. CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICES	82

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Doenças de origem alimentar influenciam a vida de milhões de pessoas e causam prejuízos econômicos significativos, envolvendo custos com tratamentos médicos, salários, negócios desfeitos, alimentos descartados e despesas associadas com a limpeza das instalações das indústrias alimentícias (NEAL, 2013).

Estudos realizados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), estimaram que nos Estados Unidos ocorrem anualmente cerca de 48 milhão de casos de doenças relacionadas com alimentos, resultando em 3.000 mortes e 128 mil hospitalizações (SCHARFF, 2012). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), os dados relacionados com as doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil não são completos (BRASIL, 2011), entretanto, acredita-se que no período de 2000 a 2011 ocorreu um total de 8.663 casos de DTAs no Brasil, e em mais da metade destes casos as causas foram desconhecidas (4148), inconclusivas (450) ou inconsistentes (138). Além disso, segundo a SVS, (BRASIL, 2011) o principal local de ocorrência destes surtos foram as residências dos pacientes, sendo a *Samonella* spp. o principal agente etiológico.

Dentre os agentes que causam doença de origem alimentar destacamos neste trabalho a bactéria *Listeria monocytogenes*, responsável pela doença denominada listeriose. Apesar de baixa incidência, a listeriose representa importante risco à saúde pública, pelo grau de severidade das sequelas e alto índice de letalidade (20% a 30%) (FARBER; PETERKIN, 1991; PORT; FREITAG, 2007; ROCOURT, 1996). Apesar disso, em nosso país há carência de informações sobre esse importante patógeno. Assim, verifica-se a necessidade de intensificar e aprofundar a pesquisa sobre *L. monocytogenes* para que se possa dimensionar a real importância deste patógeno em nosso meio. Além disso, há necessidade de se estabelecer a relação entre patogenicidade de *L. monocytogenes* isoladas no Brasil e condições encontradas em pacientes e em alimento para melhor entender a interação entre os micro-organismos, alimentos e doenças humanas.

1.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* até pouco tempo era composto por seis espécies, sendo a *L. monocytogenes* a principal causadora de doença em humanos (GASANOV et al., 2005; McLAUHLIN et al., 2004; REISSBRODF, 2004; SAUDERS et al., 2012).

Entretanto, em 2010, duas novas espécies foram reportadas: *L. rocourtii* e *L. marthii* (SAUDERS et al., 2012).

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, que pode ser classificada em 13 sorotipos diferentes com base em antígenos somático (O) e flagelar (H). Entretanto, cerca de 96% dos casos listeriose humana são causados por apenas três sorotipos: 1/2a, 1/2b, 4b (CHAE; SCHRAFT, 2000; FARBER; PETERKIN, 1991; HAIN et al., 2007; LIU et al., 2007; PORT; FREITAG, 2007; ROCOURT, 1996).

A listeriose em adultos é assintomática ou causa sintomas brandos semelhantes à gripe ou gastroenterite (HANDA-MIYA et al., 2007). Entretanto, a infecção em indivíduos pertencentes a grupos de risco como mulheres grávidas, imunocomprometidos e idosos, a doença pode ser invasiva e resultar em aborto, septicemia e meningoencefalite (HANDA-MIYA et al., 2007; McGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007; SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007).

A ocorrência da listeriose é relativamente baixa (2-15 casos por milhão de pessoas por ano), mas pode apresentar alta taxa de letalidade, de 20 a 30% (GAHAN; HILL, 2005; HAIN et al., 2007). Estudos demonstraram o aumento no número de casos de listeriose na França, onde a incidência de 3,5 casos em humanos no período de 2001-2005 passou para 4,6 em 2006 e 5,6 em 2007 (GOULET et al., 2008; ROCHE et al., 2009). Outros oito países da União Europeia também demonstraram um aumento nos casos de listeriose desde o ano 2000, acometendo principalmente pessoas acima de 60 anos (ROCHE et al., 2009; TODD; NOTERMANS, 2011).

As investigações sobre surtos e casos esporádicos de listeriose têm claramente indicado que o consumo de alimentos contaminados é a maneira mais comum de transmissão de *L. monocytogenes* (ADZITEY; HUDA, 2010; RAMASWAMY et al., 2007; ROCOURT, 1996). Dentre os alimentos mais comumente incriminados com surtos destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob-refrigeração e ingeridos sem aquecimento prévio: leite e produtos lácteos, carne e derivados, vegetais e frutos do mar (ADZITEY; HUDA, 2010; FARBER; PETERKIN, 1991; RAMASWAMY et al., 2007).

O custo econômico relacionados com as DTAs nos Estados Unidos é maior que 50 bilhões de dólares por ano, atingindo mais de 48 milhões de pessoas (BERMÚDEZ-AGUIRRE, BARBOSA-CÁNOVAS, 2013). Vegetais de folhas verdes

são considerados o segundo veículo mais comum de DTAs nos Estados Unidos (KYLE et al., 2010). Recentemente, foi observado um aumento no número de surtos de origem alimentar associado com frutas e hortaliças em várias partes do mundo (CDC 2012; DING et al., 2012; KYLE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; SANTANA et al., 2012).

Alguns trabalhos modelo vêm demonstrando o grande potencial que as hortaliças têm em serem contaminadas por *L. monocytogenes*. Ding et al. (2012) realizaram um estudo modelo para analisar o risco de contaminação de hortaliças por *L. monocytogenes* e concluíram que havia um alto potencial de incidência de listeriose nas condições estudadas (11,9-17,4 casos por milhão pessoas). Doménech et al. (2013) utilizaram modelos matemáticos para determinar papel do consumidor no estágio de higienização de alface artificialmente contaminada por *Listeria monocytogenes* e sua correlação com a probabilidade de ocorrência de listeriose. Os resultados daqueles autores mostraram que embora iniciativas de consumidores fossem eficientes para descontaminação do alimento apenas quando a população de *L. monocytogenes* era menor que 3 log UFC/g, ainda assim esta etapa poderia ser considerada essencial para redução da contaminação de alfaces e garantia da inocuidade desse alimento.

Em 2011, foi relatado o primeiro surto de listeriose associado com melão cantaloupe *in natura* nos EUA. Aquele surto foi considerado um dos mais devastadores na história dos EUA por atingir 28 estados e por acometer um total de 147 indivíduos sendo que 33 casos resultaram em óbito (CDC, 2012).

A ocorrência de casos de listeriose depende do nível de contaminação dos produtos alimentícios e do tipo de alimento, da imunidade do hospedeiro e do potencial de virulência das cepas (HANDA-MIYA et al., 2007; WERBROUCK et al., 2007; WERBROUCK et al., 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION [WHO], 2004).

No Brasil, os surtos e/ou casos de listeriose são subdiagnosticados e/ou subnotificados. Entretanto, alguns pesquisadores realizaram estudos em relação à prevalência e característica de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no país, mas sem estabelecer algum tipo relação com a via de transmissão do patógeno (CRUZ et al., 2008). Em 1989, foram diagnosticados no Instituto de Saúde do Distrito Federal (ISDF) três casos de meningite bacteriana associadas a *L. monocytogenes*. Os pacientes foram um recém-nascido, uma criança e um adulto, sendo que este último resultou em óbito (CRUZ et al., 2008, HOFER et al., 1998).

Landgraf et al. (1999) isolaram *L. monocytogenes* (sorotipo 4b) do líquido cefalorraquidiano (LCR) de cinco crianças recém-nascidas em um hospital da Grande São Paulo, sendo que três daquelas crianças não sobreviveram.

No Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), durante o ano de 2000, foram realizadas coletas de dez placentas provenientes de abortos ou partos prematuros. A partir de análise microscópica e avaliação imunohistoquímica foi observado que 50% das amostras analisadas foram positivas para *L. monocytogenes*. Estes resultados demonstraram que *L. monocytogenes* é uma importante causa de doença no Brasil, entretanto, pouca importância é dada em relação à sua investigação e seu diagnóstico (CRUZ et al., 2008; SCHWAB, EDELWEISS, 2003).

No Brasil, a única legislação que exige o controle de *Listeria* em alimentos processados é destinada a queijos de média, alta e muito alta umidade, sendo adotada a tolerância zero (ausência) em 25g de produto (BRASIL, 2001). Entretanto, alguns trabalhos já comprovaram a ocorrência deste patógeno em diversos alimentos no Brasil incluindo: mussarela e presunto (RATTI, 2006), salame (SAKATE et al., 2003), camarão (DESTRO; LEITA; FARBER, 1996), hortaliças (FRÖDER et al., 2007, OLIVEIRA et al., 2010), peixe surubim (ALVES et al., 2005).

1.2. Patogenicidade

L. monocytogenes é uma bactéria ubiqüitária, sendo capaz de viver em diferentes ambientes na forma livre, na forma de biofilmes ou na forma intracelular nas células do hospedeiro (GIANOTTI et al., 2008; SCORTTI et al., 2007).

Durante o processo de infecção, *L. monocytogenes* enfrenta condições adversas que constituem o sistema de defesa do hospedeiro (GAHAN; HILL, 2005). Antes de colonizar o trato gastrointestinal (TGI) o patógeno deve sobreviver ao pH ácido do estômago (cerca de pH 2), assim como à alta osmolaridade (equivalente a 0,3M de NaCl) e a presença de sais biliares no intestino. A capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver a estes ambientes é fundamental para o início da infecção (GAHAN; HILL, 2005; LIU et al., 2007; SEALOR; CLIFFORD; HILL, 2007, SEVEAU et al., 2007).

A listeriose pode se apresentar na forma de infecção não invasiva limitada ao intestino e que é caracterizada por uma gastroenterite febril acompanhada de vômitos e diarreia; ou por uma infecção invasiva localizada ou sistêmica (CRUZ et

al., 2008; SEVEAU et al., 2007; TODD, NOTERMANS, 2011). A adesão às células do intestino do hospedeiro é considerada a primeira etapa do processo invasivo de *L. monocytogenes* (LIU et al., 2007). A presença de proteínas na superfície da bactéria interage com receptores específicos nas membranas das células do hospedeiro e dá início a uma cascata de reações que levam à internalização da bactéria (JARADAT; BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; McGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007). Após a adesão, a bactéria entra no hospedeiro por fagocitose ou endocitose e em seguida, *L. monocytogenes* escapa do vacúolo fagocítico por meio de poros formados pela listeriolisina-O, fosfolipase fosfotidil-inositol e fosfolipase C (JARADAT; BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; MERTINS et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008; TILNEY; TILNEY, 1993). Livre no citosol, a bactéria multiplica-se, infecta células adjacentes e pode entrar na corrente sanguínea (Figura 1) (JARADAT; BHUNIA, 2002; TÉMOIN et al., 2008; TILNEY; TILNEY, 1993).

Figura 1: Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (Fonte: CRUZ et al., 2008).

O sucesso da infecção de *Listeria* requer a presença e a expressão de genes de virulência, sendo que vários deles têm sido identificados e estudados (JARADAT; BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; MERTINS et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008).

A maioria dos genes que codificam os fatores de virulência está localizados no cromossomo de *Listeria* (MERTINS et al., 2007). Alguns destes genes de

virulência estão relacionados com a fase intracelular da bactéria e são regulados pelo fator central de transcrição PrfA (JARADAT; BHUNIA, 2002; MbGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007; MERTINS et al., 2007; SCHWAB et al., 2005). Dentre os genes de virulência, os mais relevantes para o processo invasivo são o *hly*, *InlA*, *InlB*, *plcA* e *plcB* e *ActA* que codificam respectivamente listeriolisina-O, internalina A, internalina B, fosfatidil-inositol, fosfolipase C e proteínas de polimerização da actina (JARADAT; BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; MERTINS et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008; TILNEY; TILNEY, 1993). Liu et al. (2007) demonstraram que a presença ou ausência de genes da família *inl* seria um bom indicador para avaliar o nível de virulência das cepas de *L. monocytogenes*. A internalina A é uma proteína de superfície de 80 kDa, codificada pelo gene *InlA*, que liga-se ao receptor E-caderina da célula do hospedeiro e é considerada fundamental para viabilizar a invasão por *L. monocytogenes* às células eucarióticas (JARADAT; BHUNIA, 2002; McGANN; WIEDMANN; BOOR, 2007). Além daqueles, o fator σ^B também está bastante relacionado neste processo já que ele é fundamental na resistência a uma variedade de condições de estresse (SCHAIK; ABEE, 2005) e parece exercer um papel crucial na sobrevivência deste micro-organismo no trato gastrointestinal (SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007).

Já se sabe que algumas bactérias podem adaptar-se rapidamente a diferentes ambientes, por meio da modulação da expressão de seus genes, produzindo diferentes proteínas de acordo com as condições encontradas (ROMBY; VANDENESCH; WAGNER, 2006; SCHAIK; ABEE, 2005; SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007).

Em alguns trabalhos foram demonstrados que isolados de *L. monocytogenes* podem ter diferentes níveis de virulência (LIU et al., 2007; ROCHE et al., 2009; TABOURET et al., 1991). Tabouret et al. (1991) relataram que 21% dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de produtos alimentícios foram considerados fracos ou não patogênicos em infecção experimental em camundongos imunocomprometidos. Estudo realizado por Roche et al. (2009) demonstrou que das 380 cepas de *L. monocytogenes* estudadas, 10 foram consideradas de baixa virulência, sendo estas isoladas de produtos lácteos, cárneos, prontos para o consumo e do ambiente (ROCHE et al., 2009).

Os alimentos como parte do ambiente de multiplicação de bactérias, podem conter diferentes níveis e tipos de nutrientes que podem interferir na expressão de

genes de virulência (GARNER et al., 2006; JARADAT; BHUNIA, 2002). Jaradat; Bhunia, (2002) demonstraram que a glicose, melhor fonte de carbono para as bactérias, pode exercer um efeito repressor em alguns fatores de virulência. Garner et al. (2006) também demonstraram que alto pH, presença de NaCl e ácidos orgânicos na formulações de alguns alimentos podiam aumentar a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* em até 1000 vezes.

Olesen et al. (2009) avaliaram a relação entre a exposição a ácidos orgânicos e presença de NaCl a longo prazo, com a transcrição de genes e o potencial de virulência por *L. monocytogenes*. Naquele estudo foi demonstrado que a exposição a ácidos e presença de NaCl induz significativamente a transcrição de vários genes de virulência e da resposta ao estresse em *L. monocytogenes*, além de aumentar a capacidade de adesão a células Caco-2.

Rantsiou et al. (2012) desenvolveram 54 sondas de microarranjo de DNA contendo genes responsáveis pela virulência, adesão e resposta ao estresse com a finalidade de se estudar a expressão daqueles genes quando *L. monocytogenes* fosse exposta a sistemas alimentares. Naquele trabalho, não houve diferenças nos perfis de expressão entre os três isolados de *L. monocytogenes* quando testados em BHI. Por outro lado, em presença do caldo de carne e salsichas, os genes *iap*, *gadC* *gadE* e em conjunto com diferentes genes relacionados com internalina, apresentaram níveis variados de expressão gênica. Recentemente, Kuda et al. (2012) avaliaram o efeito da caseína do leite, da proteína de soja e seus respectivos derivados (triptona e peptona) na invasão e infecção de células Caco-2 e em camundongos. Naquele trabalho foi demonstrado que a porcentagem da invasão a células Caco-2 tende a ser maior quando cultivado em caldo contendo triptona.

Longhi et al. (2008) demonstraram que a utilização de proteases reduziu ou inibiu completamente a capacidade de formação de biofilmes, hemólise e invasão a célula Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes*. Em estudo realizado por Andersen et al. (2007) foi observado que isolados de *L. monocytogenes* submetidos à restrição de oxigênio foram cerca de 100 vezes mais invasivos a células Caco-2 do que quando cultivados sem nenhuma restrição de oxigênio.

Petrone et al. (1998) relataram que a eficácia da invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 foi reduzida em presença de ácido láurico, ácido linoléico e ácido linolênico (de 20 a 500 vezes). Aqueles pesquisadores sugeriram que os ácidos graxos naturais do leite e seus derivados poderiam influenciar a

multiplicação das bactérias e a sua invasividade, podendo atuar como barreira na infecção por *L. monocytogenes*.

Além disso, outros componentes parecem influenciar a virulência bacteriana. Carey et al. (2008) demonstraram que a presença de probiótico, assim como ácidos orgânicos produzidos por bactérias lácticas (BAL), diminuiu a expressão do gene que codifica toxina shiga-2 em *E. coli* STEC. Upadhyay et al. (2012) observaram que compostos antimicrobianos derivados de plantas também possuem potencial em reduzir a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes*. Deste modo, fica clara a importância do aprofundamento de conhecimentos sobre uma possível modulação da expressão dos genes envolvidos no processo invasivo de *L. monocytogenes*.

Vários modelos de estudo *in vitro* e em animais têm sido desenvolvidos para o estudo da patogenicidade e virulência de *L. monocytogenes* (LIU et al., 2007; ROCHE et al., 2009; TABOURET et al., 1991). Estudos com cultura de tecidos, como a linhagem de células epiteliais de intestino Caco-2, são fundamentais para estudar características particulares dos fatores de virulência e são amplamente utilizados para avaliar a capacidade de adesão, invasão e multiplicação intracelular por diferentes cepas (OLESEN et al., 2009; XU et al., 2009).

Outro método bastante importante na avaliação da virulência das cepas de *L. monocytogenes* é a transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR), para estudos de expressão gênica. Esta técnica tem as vantagens de ser sensível e rápida se comparada com métodos de quantificação convencionais como o *Northen blot* (CAREY et al., 2008; WERBROUCK et al., 2007). Recentemente, a utilização das técnicas com microarranjos ou “chips” de DNA, que consistem num conjunto ordenado de milhares de moléculas de DNA cujas sequências são conhecidas, vem sendo bastante utilizadas. Esta técnica permite a análise de expressão gênica em ampla escala e seu avanço foi impulsionado pela necessidade de se analisar a grande quantidade de informação gerada pelo sequenciamento de genomas. A técnica de microarranjo de DNA apresenta ainda vantagens de logística e sensibilidade, com a possibilidade de se obter a expressão de genomas inteiros em pequeno número de experimentos e a facilidade em interpretação dos dados obtidos (RANTSIOU et al., 2012; SLONIM; YANAI, 2009; VANGUILDER et al., 2008).

1.3. Biofilmes

O primeiro relato sobre os biofilmes ocorreu há mais de 60 anos e até hoje este assunto desperta grande interesse para o processamento de alimentos, com importância na fabricação de cerveja, laticínios, em produtos frescos e carnes, além de ter implicação nas áreas: ambiental e biomédica (SIMÕES et al., 2010). Biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas embutidas em uma matriz de exopolissacarídeos (EPS) produzidas pelas próprias células aderidas em uma superfície abiótica ou biótica (DUNNE, 2002; RIGANO et al., 2007). A matriz dos biofilmes pode ser formada por polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e DNA extracelular (eDNA) (PERRY et al., 2009; PETERSEN et al., 2005; TETZ et al., 2009; VILAN et al., 2009).

A presença de DNA extracelular (eDNA) na matriz extracelular dos biofilmes foi observada primeiramente em biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* (STEINBERGER; HOLDEN 2005; VILAN et al., 2009; WHITCHURCH et al., 2002), e desde então ele é reconhecido como um dos principais constituintes da matriz (PERRY et al., 2009; PETERSEN et al., 2005; VILAN et al., 2009). O eDNA exerce uma função muito importante no desenvolvimento de biofilmes e acredita-se que esteja envolvido no fornecimento de substratos para células adjacentes, integridade e manutenção da estrutura tridimensional bem como na troca de material genético (TETZ et al., 2009; VILAN et al., 2009; WU; XI, 2009). O eDNA pode ser obtido a partir de células lisadas, entretanto, já se sabe que células vivas podem secretá-lo por meio de vesículas transportadoras, por meio de um provável mecanismo de secreção ativa (TETZ et al., 2009; WU; XI, 2009).

O processo de adesão a superfícies inertes envolve vários fatores como força de van der Waals e eletrostáticas, além de interações hidrofóbicas. A adesão bacteriana também depende de estruturas moleculares específicas da superfície da célula, como os flagelos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; DUNNE, 2002; PAN et al., 2006; TRESSE et al., 2007). Além disso, a adesão inicial das células e a formação de biofilmes são influenciadas por vários fatores: características da cepa, fase de crescimento da bactéria, temperatura, meio de crescimento e presença de outros micro-organismos (DUNNE, 2002; CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; PAN et al., 2006; TRESSE et al., 2007). A sinalização célula-célula, conhecida como *quorum sensing*, também tem sido relacionada com a formação de biofilmes devido à produção e

detecção de moléculas sinalizadoras chamadas de auto-indutoras (GANDHI; CHIKINDAS et al., 2007).

No processo de formação de biofilme, ocorre inicialmente adesão de células planctônicas a uma superfície de modo reversível, dependente de fatores físico-químicos como forças de atração e repulsão, hidrofobicidade e características da célula microbiana. Após a adesão primária e diante de condições favoráveis, a bactéria consolida seu processo de aderência com a produção de exopolissacarídeos, tornando o processo irreversível. Em seguida o biofilme passa por processo de crescimento, maturação e dispersão (Figura 2) (DUNNE, 2002).

Figura 2: Representação esquemática das etapas de formação do biofilme: 1) adesão inicial das células bacterianas na superfície, 2) EPS é produzido e adesão se torna irreversível, 3 e 4) a arquitetura do biofilme se desenvolve e amadurece e 5) as células são dispersas do biofilme (Fonte: MONROE, 2007).

Algumas cepas de *L. monocytogenes* são conhecidas por persistirem no ambiente de processamento de alimentos por extensos períodos formando biofilmes (PAN et al., 2006). Miettinen; Björkroth e Korkeala (1999) ao pesquisarem a ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies e em produtos prontos de uma indústria de sorvetes, relataram que cepas com o mesmo perfil de gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE) estavam presentes em amostras coletadas por até sete anos.

Para o controle de patógenos em alimentos e em ambientes de processamento de alimentos, é importante evitar a formação de biofilmes, por meio de higienização do local de processamento, escolha de modelos adequados de equipamentos, tipo de material da linha de produção e seleção correta de

detergentes e desinfetantes, em associação com métodos de remoção mecânica (AMMOR et al., 2006; CARPENTIER; CERF, 2011; JESSEN; LAMMERT, 2003; MAUKONEM et al., 2003; SHAKERI et al., 2007).

A utilização de peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas apresenta grande potencial para o controle de biofilmes na indústria de alimentos (AMMOR et al., 2006; GUERRIERI et al. 2009; MINEI et al., 2008; WINKELSTROTER et al., 2011). Recentemente, Sandasi et al. (2008), Jadhav et al. (2013) e Desai et al. (2012) observaram que diferentes óleos essenciais de plantas apresentaram capacidade de inibir a adesão das células de *Listeria* em superfície de poliestireno e aço inoxidável. Em um outro estudo, foi observado que o EDTA em concentrações baixas inibiu a formação de biofilme de *L. monocytogenes*, sugerindo que EDTA influenciava o processo de adesão inicial das células de *L. monocytogenes* em superfícies abióticas (CHANG et al., 2012).

Grande número de sistemas modelos para se estudar a formação e o desenvolvimento dos biofilmes *in vitro* têm sido empregados e em sua grande maioria a quantificação é feita pelo método convencional de contagem em placa (DONLAN; COSTERTON, 2002; MINEI et al., 2008; PEETERS, NELIS, COENYE; 2008; SHAKERI et al., 2007). Entretanto, diferentes estudos têm quantificado os biofilmes em placa de microtitulação baseando-se na quantificação de biomassa, de viabilidade e da matriz dos biofilmes (CHANG et al., 2012; HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007; PEETERS, NELIS, COENYE; 2008; SHAKERI et al., 2007, TAKAHASHI et al., 2009).

O ensaio com placa de microtitulação possui vantagens em relação a outros métodos para avaliar a formação de biofilmes em termos de objetividade, precisão, simplicidade e rapidez para, por exemplo, avaliar as diferenças na formação de biofilmes entre cepas ou determinar a eficácia de biocidas (CHANG et al., 2012; HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007; PEETERS, NELIS, COENYE; 2008; SHAKERI et al., 2007; TAKAHASHI et al., 2009; TRESSE et al., 2007).

O corante cristal violeta tem sido utilizado como indicador na quantificação da biomassa de biofilmes em ensaio com placa de microtitulação baseando-se na sua ligação com moléculas de superfície negativas das células bacterianas e com polissacarídeos da matriz extracelular (LI et al., 2003; STEPANOVIC et al., 2000). Segundo a literatura, este tipo de ensaio possui alta reprodutibilidade, entretanto

este corante não pode ser utilizado para avaliar a viabilidade e atividade das células em biofilme (LI et al., 2003; STEPANOVIC et al., 2000).

Em estudo realizado por Harvey, Keenan e Gilmour (2007), foi avaliada a formação de biofilmes por 138 cepas de *L. monocytogenes* de origem clínica, alimentos e ambiente de processamento de alimentos, por meio de ensaio em placa de microtitulação com cristal violeta. Naquele estudo, cerca de 92% das cepas foram classificadas como fracas produtoras de biofilme, 6,5 % como moderadas e 1,5% como fortes produtoras de biofilme.

O nível da formação dos biofilmes pode ter uma relação importante com a colonização e virulência da cepa no hospedeiro (NAVES et al., 2008; SANDAL et al., 2007). Naves et al. (2008) observaram uma alta correlação entre a habilidade de multiplicação em biofilme e a coexistência de pelo menos três determinantes de virulência em cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas, entre eles uma maior expressão da hemolisina. Sandal et al. (2007), observaram que diferenças na arquitetura do biofilme de *Histophilus somni* poderiam estar correlacionadas com a patogenicidade, uma vez que uma cepa isolada de um caso de pneumonia formava mais biofilme em comparação com uma cepa comensal.

Recentemente, Safadi et al. (2012) analisaram a correlação entre a formação de biofilme *in vivo* e a expressão de genes de virulência de *Escherichia coli* O104:H4. Esta linhagem foi responsável por um surto de origem alimentar na Alemanha, em 2011, com ocorrência de grande número de casos de síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e a mortes. Naquele estudo foi observado que *E. coli* O104: H4 produzia um biofilme estável *in vitro*. Além disso, os dados indicaram que a formação de biofilmes estava correlacionada com uma maior expressão dos genes de virulência *in vivo*, em estudos realizados em camundongos.

1.4. Probióticos

O termo probiótico foi introduzido na década de 1970 para descrever suplementos alimentares microbianos para humanos e animais (TINH et al., 2008). Atualmente, probióticos são definidos como micro-organismos viáveis ou componentes de células microbianas, que quando ingeridos em quantidade apropriado, tem o potencial de beneficiar a saúde do hospedeiro (COLLADO et al., 2008; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; SZEKÉR et al., 2007).

A microbiota do intestino humano constitui um ecossistema complexo que exerce um papel importante para uma vida saudável (COLLADO et al., 2008; GAHAN; HILL, 2005), por meio da manutenção de uma microbiota intestinal balanceada, importante para o controle de infecções por bactérias potencialmente patogênicas (CANDELA et al., 2005; FORESTIER et al., 2001). A quantidade de bactérias que compõe a microbiota varia de 10^{11} a 10^{12} UFC/g de conteúdo luminal, contendo até 500 espécies diferentes (CANDELA et al., 2005; ZOETENDAL et al., 2008).

Doenças intestinais, tratamento com antibióticos, estresse e mudanças na dieta podem resultar em depleção e desbalanceamento da microbiota intestinal (FORESTIER et al., 2001). Deste modo, a reposição da microbiota intestinal pode ser necessária, com o emprego de bactérias probióticas (CANDELA et al., 2005; COLLADO et al., 2008; MAINVILLE; ARCAND; FARNWORTH, 2005).

A mucosa do trato gastrointestinal é susceptível a adesão e colonização por patógenos de origem alimentar como: *Salmonella* Typhymurium, *Listeria monocytogenes* e *Shigella* spp. (CANDELA et al., 2005; COLLADO et al., 2008; FORESTIER et al., 2001; JANKOWSKA et al., 2008; MORONI et al., 2006; XU et al., 2009). A infecção por estes patógenos se inicia com a etapa de adesão e posteriormente, invasão de células intestinais por mecanismos variados, que envolvem estruturas filamentosas, proteínas de superfície de célula, ligantes específicos ou formação de biofilmes (XU et al., 2009).

Considerando que para o início do processo de adesão é necessária a interação entre patógeno e hospedeiro, os probióticos podem ser utilizados como uma estratégia para prevenção da adesão de bactérias patogênicas a células do epitélio do trato gastrointestinal por exclusão competitiva (COLLADO et al., 2008; GAHAN; HILL, 2005; XU et al., 2009). A adesão de cepas probióticas varia dependendo das propriedades da superfície da célula como hidrofobicidade e perfil extracelular de proteínas (XU et al., 2009).

Alguns estudos demonstraram efeitos antagônicos de probióticos frente a *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Escherichia* spp (COLLADO et al., 2008; GAHAN; HILL, 2005; JANKOWSKA et al., 2008; MORONI et al., 2006).

A maioria dos probióticos pertence às espécies dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (COLLADO et al., 2008, XU et al., 2009). O critério de escolha e

definição de probióticos inclui ensaios *in vitro* para demonstrar a ausência de propriedades patogênicas, tolerância a condições gastrintestinais (acidez gástrica, sais biliares e fluidos pancreáticos), capacidade de adesão à mucosa gastrintestinal, atividade antimicrobiana, competição e exclusão de patógenos, estimulação do sistema imune, além de boas características tecnológicas (COLLADO et al., 2008; DELGADO et al., 2008; MAINVILLE; ARCAND; FARNWORTH, 2005; SZEKÉR et al., 2007; XU et al., 2009). Além disso, também são necessários estudos clínicos para a confirmação da eficácia de um probiótico (DELGADO et al., 2008; TINH et al., 2008).

Bactérias lácticas (BAL) são conhecidas por suas propriedades como cultura *starters* e podem contribuir para a inocuidade de alimentos (bioconservação) e produção de compostos de sabor e aroma (TODOROV; DICKS, 2005).

As BAL podem produzir uma série de compostos com atividade antimicrobiana que também podem interferir na aderência de bactérias patogênicas em células intestinais: ácido lático e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e bacteriocinas (COLLADO et al., 2008; DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; JANKOWSKA et al., 2008; MATARAGAS et al., 2003; SERVIN; COCONNIER, 2003).

Forestier et al. (2001) observaram que o sobrenadante de uma cultura em caldo de *L. casei* subsp *ramnosus* Lcr35 inibiu a multiplicação de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium difficile*.

Algumas bactérias lácticas podem prevenir a adesão de patógenos *in vitro*, reduzindo a colonização e infecções (COLLADO et al., 2008; JANKOWSKA et al., 2008). Jankowska et al. (2008) demonstram que *Lactobacillus paracasei* reduziu cerca de 8 vezes a adesão de *Salmonella enterica* em célula de linhagem de epitélio intestinal Caco-2. Lavermicocca et al. (2008) observaram que *L. paracasei* e *L. plantarum* apresentavam potencial de inibir a adesão intestinal por *Yersinia enterocolitica*, além de resistir a baixo pH e presença de sais biliares.

Estudo realizado por Xu et al. (2009), demonstrou que a adesão de *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *S. boydii* e *S. aureus* a células Caco-2 foram significativamente inibidas na presença da cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG. Além disso, também foi observado que *Bifidobacterium longum* B6 teve altas taxas de adesão à células Caco-2, inibindo de forma eficaz a adesão de patógenos.

Xu et al. (2009) sugeriram que o mecanismo de ação envolvido era competição por sítios de ligação às células Caco-2 ou produção de metabólitos inibitórios tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

Recentemente, Gomes et al. (2012) demonstraram que *Lactobacillus sakei* 1 foi capaz de sobreviver a condições gastrointestinais *in vitro* e de reduzir a invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2, indicando o seu potencial probiótico.

Moroni et al. (2006), utilizaram o método de hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) para demonstrar a inibição da adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 em presença de *Bifidobacterium*. O método de FISH apresenta a vantagem de permitir a detecção e enumeração de micro-organismos específicos em amostras clínicas e ambientais, sendo baseado na ligação específica de um oligonucleotídeo intercalado a um marcador fluorescente à célula de interesse (FUCHIZAWA et al., 2008).

Diante do exposto, no presente trabalho foram avaliadas as possíveis correlações entre a formação de biofilmes e modulação de características de virulência de *L. monocytogenes* por fatores relacionados a alimentos e o trato gastrointestinal.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Analisar a expressão gênica, a formação de biofilmes e a adesão/invasão *in vitro* de células eucarióticas por *L. monocytogenes*, em diferentes condições encontradas no trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas de bactérias láticas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a formação de biofilme por *L. monocytogenes* por meio da quantificação de biomassa por coloração com cristal violeta em condições ideais de cultivo e sob condições adversas (baixo pH, alta osmolaridade, presença de sais biliares e bacteriocinas).
- Avaliar a capacidade de adesão e invasão de célula Caco-2 por *L. monocytogenes* incubada em condições ideais e em condições adversas utilizando a técnica de semeadura em placa.
- Avaliar a capacidade de bactérias láticas com potencial probiótico em modular a adesão de *L. monocytogenes* as células Caco-2, utilizando as técnicas de semeadura em placa e hibridação *in situ* por fluorescência (FISH).
- Avaliar a expressão do gene *InlA* de *L. monocytogenes* em condições ideais de cultivo em caldo e em condições adversas, por meio da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Culturas bacterianas

Neste trabalho, foram analisados isolados de *L. monocytogenes* pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – USP. Foram incluídos no estudo, isolados de origem clínica doados pelo Dr. Ernesto Hofer, (IOC/ FIOCRUZ-RJ) e isolados de alimentos e ambientes de processamento de alimentos, doados pela Profa. Dra. Maria Teresa Destro, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo (FCF– USP). Isolados de origem animal pertencente ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – INCQS, Laboratório de Microrganismos de Referência – FIOCRUZ, também foram incluídas no estudo (tabela 1). As culturas foram mantidas a -80°C em caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) (Oxoid, UK) suplementado com 20% de glicerina, e eram reativadas em caldo BHI por 24 horas a 37°C para realização dos experimentos. Foram utilizadas também bactéria lácticas (BAL) produtoras de bacteriocinas (*Lactobacillus sakei* 1, *Leuconostoc mesenteroides* A11 e *Enterococcus faecium* 130) isoladas de alimentos, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP (GOMES et al., 2008; MARTINEZ; DE MARTINIS, 2005).

Tabela 1. Isolados de *L. monocytogenes* estudados no presente trabalho, suas origens e fontes de isolamento*.

Design do isolado	Origem	Fonte de isolamento
L.m. ATCC 19115	FCFRP-USP	Clínica
L.m. HU 471	IOC/ FIOCRUZ	Líquido cefalorraquidiano
L.m. HU 533	IOC/ FIOCRUZ	Sangue
L.m. Vi-1	FCFRP-USP	Surubim defumado
L.m. H-2	FCFRP-USP	Hortaliças
L.m. FCF 11	FCF– USP	Presunto
L.m. INCQS 327/ ATCC 19117	INCQS/ FIOCRUZ	Carneiro
L.m. INCQS 353/ ATCC 15313	INCQS/ FIOCRUZ	Coelho
L.m. Reg. 26c	FCFRP-USP	Fatiador de frios
L.m. FCF 4	FCF– USP	Piso de área de processamento de alimentos

*Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP (CEP/FCFRP), com protocolo número 176. L.m.=*Listeria monocytogenes*, ATCC: American Type Culture Collection, FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, FCF-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – Universidade de São Paulo, INCQS/ FIOCRUZ: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/ Fundação Oswaldo Cruz, IOC/ FIOCRUZ: Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz.

3.2. Estudos com bacteriocinas semi-purificadas

Para obtenção de bacteriocinas semi-purificadas, *Lactobacillus sakei* 1 e *Leuconostoc mesenteroides* A11 foram reativados em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS - Oxoid, UK), por 24h/25°C, e *Enterococcus faecium* 130 foi reativado em caldo MRS por 24h/37°C. Após esse período, cada uma das culturas foi inoculada individualmente a 1% (v/v) em frascos tipo Erlenmeyer, contendo caldo MRS e foram incubadas por 24 horas nas temperaturas já descritas. Em seguida, cada cultura foi centrifugada a 6720g (Sorvall RC Plus, Du Pont, UK) por 20 minutos a 4°C e o

sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana 0,22µm (GVWP Millipore, EUA), para obtenção da bacteriocina semi-purificada. O filtrado foi neutralizado a pH 7,0 com NaOH 4 mol/L e antes da utilização nos ensaios, foi feita a quantificação de bacteriocinas. Para isso, foi realizado o ensaio de diluição crítica, utilizando placas contendo ágar BHI sólido com uma sobrecamada de 7mL de caldo BHI semi-sólido (BHI adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico – Oxoid, UK), previamente inoculado a 1% (v/v) com uma cultura de 24 horas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 obtida em caldo BHI, incubado a 37°C.

Os filtrados obtidos das culturas de BAL a serem testadas foram submetidos a diluições sucessivas em placas de microtitulação de 96 poços (Costar, EUA) com tampão fosfato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) na concentração de 10mM e pH 7,0 nas seguintes proporções: 1/1(sem diluição), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, 1/8192. Alíquotas de cada uma destas diluições (10µL) foram aplicadas na superfície das placas contendo a sobrecamada de BHI semi-sólido inoculada com *L. monocytogenes* ATCC 19115 e em seguida foram incubadas a 37°C/24h. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias por mL (UA/mL), considerando-se a recíproca da última diluição onde ocorreu inibição da multiplicação do indicador *L. monocytogenes* ATCC 19115 (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; MAYR-HARTING et al., 1972).

3.3. Estudos em condições que mimetizam o trato gastrointestinal e alimentos

Para avaliação da formação de biofilme, invasão/adesão em células Caco-2 e avaliação da expressão gênica por *L. monocytogenes* em condições que mimetizam o trato gastrintestinal e alimentos, foi utilizado caldo BHI e também caldo BHI modificado conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Condições usadas para a avaliação dos efeitos de fatores de estresse na formação de biofilme, na adesão/invasão de células Caco-2 e na expressão de gene *int A* por isolados de *L. monocytogenes*.

Condição	Descrição
Controle	BHI ¹
Sacarose	BHI + 2% sacarose ²
NaCl	BHI + 5% cloreto de sódio ²
Oxgall	BHI + 0,3% Oxgall (bile bovina) ³
HCl	BHI + 4mol/L HCl ácido clorídrico ² , pH final 4,5
Refrigeração	BHI incubado a 5°C/72h
EF Bac+	BHI + 50% v/v do extrato semi-purificado originado da cultura de <i>Enterococcus faecium</i> 130
Lcm Bac+	BHI + 50% v/v do extrato semi-purificado originado da cultura de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> A11
Ls Bac+	BHI + 50% v/v do extrato semi-purificado originado da cultura de <i>Lactobacillus sakei</i> 1

¹ Um caldo de infusão de cérebro coração (BHI), Oxoid, Reino Unido.

² Synth, Brasil.

³ Cat. n° B3883/Sigma-Aldrich, EUA.

* Todas as incubações foram realizadas a 37°C/24 h, a menos que especificado diferente.

EF: *Enterococcus faecium*, Lcm: *Leuconostoc mesenteroides*, Ls: *Lactobacillus sakei*.

3.4. Avaliação da formação de biofilmes

Foi adotada a técnica de Djordjevic; Wiedmann e McLandsborough, (2002) e Dupre et al. (2003) com algumas modificações. Culturas de *L. monocytogenes* em fase estacionária foram diluídas para cerca de 7 log UFC/mL em caldo BHI ou BHI modificado, conforme descritos no item 3.3. Foram retirados 200 µL de cada suspensão bacteriana, em seguida, este volume foi transferido para poços da placa de microtitulação de poliestireno com 96 poços não tratada (Costar, EUA) e foi realizada incubação por 24h/37°C, exceto para a condição de incubação sob-refrigeração (5°C/72h).

Para avaliar o crescimento planctônico de cada isolado nas condições propostas, o restante de cada caldo inoculado foi incubado por 24h/37°C, exceto para a condição de incubação sob-refrigeração (5°C/72h). As populações de *Listeria*

monocytogenes foram enumeradas em placas de ágar TSAye, e em seguida incubadas a 24h/ 37°C.

Para a quantificação da biomassa de *L. monocytogenes*, as placas de microtitulação tiveram seus orifícios lavados três vezes com solução salina fosfatada tamponada pH 7,0 (PBS) constituída por cloreto de sódio (0,8%) (Synth, Brasil), cloreto de potássio (0,020%) (Merck, EUA), fosfato de sódio dibásico (0,115%) (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico (0,020%) (Synth, Brasil). As células aderidas à placa de poliestireno foram coradas com 200 µL de solução aquosa de cristal violeta 1% (p/v) (Synth, Brasil) e lavadas com solução de PBS. O cristal violeta foi solubilizado em solução de etanol/acetona (80:20 v/v) e as densidades óticas foram determinadas em comprimento de onda de 595nm em espectrofotômetro com leitor de placa (UV/Vis Varian Cary 50 bio, UK). Com os valores obtidos, foi estimada a capacidade de formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes*.

Segundo Stepanovic et al. (2000) DOc é definida como a absorbância do controle negativo (meio de cultivo não inoculado) e DO é a absorbância da amostra.

Deste modo, os isolados podem ser classificados como:

$DO \leq DOc$ = não aderente;

$DOc < DO \leq 2 \times DOc$ = aderência fraca;

$2 \times DOc < DO \leq 4 \times DOc$ = aderência moderada;

$4 \times DOc < DO$ = aderência forte;

3.5. Ensaio de adesão e invasão por *L. monocytogenes* em células Caco-2

3.5.1. Cultura de células Caco-2

Células epiteliais da linhagem Caco-2 (adenocarcinoma de cólon humano-CR069) foram obtidas da coleção de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro. A linhagem celular foi rotineiramente cultivada em meio RPMI (Gibco, EUA) suplementado com soro fetal bovino (10% v/v) (Gibco, EUA), estreptomicina (100 U/mL) (Sigma-Aldrich, EUA), penicilina (100 U/mL) (Sigma-Aldrich, EUA) (RPMI completo) e mantidas a 37°C em atmosfera com 5% CO₂, até apresentarem crescimento semi-confluente, não ultrapassando 10 repiques.

As culturas de célula Caco-2 com crescimento semi-confluente foram tripsinizadas e em seguida, um mL da suspensão de células (10⁵ células/mL) foi

transferido para cada poço de uma placa de 24 poços (TPP, Suíça). Esta placa foi incubada a 37°C/24h em atmosfera com 5% CO₂. As células aderidas a estas placas foram utilizadas nos experimentos de adesão e invasão (KUSHWAHA; MURIANA, 2010, MORONI et al., 2006).

3.5.2. Ensaio de adesão de *L. monocytogenes* em células Caco-2

O ensaio de adesão foi realizado conforme descrito por Moroni et al. (2006) com algumas modificações.

Após incubação nas condições descritas no item 3.3, as culturas de *L. monocytogenes* foram diluídas para cerca de 7 log UFC/mL em solução de PBS e semeadas na superfície de placa contendo ágar soja tripticase suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSAye, Oxoid, UK), para quantificação do inóculo inicial. Em seguida, 100 µL deste inóculo, juntamente com 900 µL de meio RPMI incompleto (RPMI sem adição de soro fetal bovino e antibiótico), foram adicionados à placa de 24 poços contendo a cultura de células Caco-2 aderidas. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C por 30 minutos em atmosfera com 5% CO₂.

Os poços foram lavados duas vezes com solução de PBS para remover as bactérias não aderidas. A cultura de células contendo *L. monocytogenes* aderentes foi tratada com tripsina (Sigma-Aldrich, EUA), centrifugada a 10.000g por 10 min (Sorvall Legend Mach 1.6R, UK) e o sedimento celular foi ressuscitado em um mL de solução de PBS. Para enumeração de *L. monocytogenes* aderidas às células Caco-2, foi realizada diluição seriada decimal desta suspensão em solução de PBS e uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada em superfície de placas de ágar TSAye e foi realizada incubação por 24 a 48 horas a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

A porcentagem de adesão de *L. monocytogenes* às células Caco-2 foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ adesão} = \frac{\text{número de células de } L. \text{ monocytogenes aderidas} \times 100}{\text{número total de bactérias adicionadas por poço}}$$

3.5.3 Ensaio de invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2

A invasão de células epiteliais intestinais por *L. monocytogenes* foi estudada conforme Moroni et al. (2006), com algumas modificações.

Culturas de *L. monocytogenes* obtidas conforme condições descritas no item 3.3 foram diluídas para cerca de 7 log UFC/mL em solução de PBS e um inóculo de 100 µL foi adicionado a uma placa 24 orifícios contendo cultura de células Caco-2 com crescimento confluyente. Foram adicionados 900 µL de meio RPMI incompleto (RPMI sem adição de soro fetal bovino e antibiótico) em cada orifício e em seguida a cultura foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por 3 horas. Após incubação, foram adicionados 250 µL de solução de gentamicina 250 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) em cada poço e a placa foi incubada novamente por 1,5h para matar as células bacterianas não internalizadas.

As culturas de células Caco-2 foram lavadas com solução de PBS e em seguida foi adicionado um mL da solução de Triton X-100 (Sigma - Aldrich, EUA), diluído em PBS a 0,1% (v/v) por 10 minutos em temperatura ambiente, para lisar as células. Para a enumeração das células de *L. monocytogenes* internalizadas foram realizadas diluições decimais seriadas em solução de PBS. Uma alíquota de 100 µL de cada uma destas diluições foi semeada em superfície de ágar TSAye, com incubação por 24 a 48 horas a 37°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes.

A porcentagem de invasão de *L. monocytogenes* em Caco-2 foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ invasão} = \frac{\text{número de bactérias internalizadas recuperadas} \times 100}{\text{número total de bactérias adicionadas por poço}}$$

3.5.4. Ensaio de adesão e invasão em células Caco-2 com co-cultura de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas

Foram realizados ensaios de competição (adesão e invasão) em células Caco-2, com co-cultura de *L. monocytogenes* e BAL produtoras de bacteriocinas. As culturas de *L. monocytogenes* em caldo BHI 24h/37°C, de *L. sakei* 1 e *L. mesenteroides* A11 em caldo MRS 24h/25°C e de *E. faecium* 130 em caldo MRS 24h/37°C foram diluídas para cerca de 7 log UFC/mL em solução de PBS e enumeradas para quantificação do inóculo inicial. Em seguida, 100 µL de cultura de *L. monocytogenes* e 100 µL de cultura de *L. sakei* 1 ou *L. mesenteroides* A11 ou *E. faecium* 130 foram adicionados a uma placa de 24 poços, contendo a cultura de células Caco-2 com crescimento confluyente. Em seguida, foram também

adicionados 800 µL de meio RPMI incompleto (RPMI sem adição de soro fetal bovino e antibiótico). A partir desta etapa os ensaios de invasão e adesão foram realizados conforme item 3.5.2. e 3.5.3..Entretanto, a enumeração de *L. monocytogenes* foi realizada em ágar seletivo PALCAM (Oxoid, UK) .

3.5.4.1. Hibridação *in situ* por fluorescência para ensaio da adesão *L. monocytogenes* às células Caco-2 em co-cultivo com bactérias lácticas

Nesta etapa, foram utilizadas placas contendo células Caco-2 preparadas de acordo com o item 3.5.1., mas com lamínulas de vidro adicionadas em cada poço. O ensaio de adesão foi realizado conforme item 3.5.4 e após os 30 minutos de incubação para adesão de *L. monocytogenes* em co-cultura, os poços foram lavados duas vezes com solução de PBS, cada lamínula foi removida da placa de 24 poços e as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, EUA) por 24h/4°C.

Em seguida, as lamínulas foram lavadas com solução de PBS por duas vezes e submersas em solução etanol 50% por 1h/4°C. As lamínulas foram secas por 20 min. a 46°C e desidratadas por sucessivas imersões em solução de etanol nas concentrações 50%, 75% e 96% (v/v) por 3 min. As células foram submetidas à permeabilização enzimática com a adição de lisozima (Sigma - Aldrich, EUA) (2mg/mL) em solução tampão contendo 100 mM TrisHCl (Bioagency, Brasil) e 50 mM EDTA. Em seguida, foi feita hibridação empregando 9 µL de tampão de hibridação (20 mM TrisHCl - Bioagency, Brasil, 0,9 M NaCl - Synth, Brasil, 0.01% dodecil sulfato de sódio - Sigma - Aldrich, EUA) e 1 µL de solução de sonda fluorescente 50 ng/µL - Invitrogen, EUA (Tabela 3) por 16h/46°C. Após hibridação, as lamínulas foram lavadas por 20min a 46°C com tampão (20 mM TrisHCl - Bioagency, Brasil; 0,9M NaCl - Synth, Brasil), e coradas com 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA) por 5 min (BLASCO; FERRER; PARDO, 2003; FUCHIZAWA; SHIMIZU; KAWAI, 2008; HARMSSEN et al., 1999; LEBEER et al., 2011; NICKLAS et al., 2012).

As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro e a sua visualização foi realizada em microscópio de fluorescência Axioskop modelo 10217958681/1 (Carl Zeiss, Alemanha) em objetiva com aumento de 100x e ocular 10x. Foi utilizada uma câmera fotográfica modelo AxioCam HRc (Carl Zeiss, Alemanha) e o programa AxionVision Release 4.7 05-2008 (Carl Zeiss, Alemanha) para captura das imagens.

Tabela 3. Sondas fluorescentes para hibridação *in situ* por fluorescência*

Sonda	Especificidade	Sequência (5' – 3')	Fluoróforo
EUB338	Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Fluoresceína
NON338	Controle negativo	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Fluoresceína
Lis-1400	<i>Listeria</i> spp.	CGCACATTTCCATTCTGTGCGATTCC	Rodamina
LU2	<i>Leuconostoc</i> spp.	GATCCATCTCTAGGTGACGCCG	Fluoresceína
Lab158	<i>Lactobacillus</i> spp.	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	Fluoresceína
Enc221	<i>Enterococcus</i> spp.	CACCGCGGGTCCATCCATCA	Fluoresceína

*As sondas foram desenvolvidas segundo BLASCO; FERRER; PARDO, 2003; FUCHIZAWA; SHIMIZU; KAWAI, 2008; HARMSSEN et al., 1999; LEBEER et al., 2011; NICKLAS et al., 2012. A síntese foi feita pela empresa Invitrogen, EUA.

3.6. Avaliação da expressão do gene *lnlA* em isolados de *L. monocytogenes* quando submetidos a condições que mimetizam o trato gastrintestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas

Cada isolado de *L. monocytogenes* foi cultivado em caldo BHI por 24h/37°C e de cada cultura, 8mL foram centrifugados a 17.000g por 5 min. (Sorvall Legend Mach 1.6R, UK). O *pellet* foi ressuscitado em um mL caldo BHI ou BHI modificado (conforme descrito no item 3.3) e 100 µL foram retirados desta suspensão para enumeração de *L. monocytogenes* pela semeadura em superfície de placas de ágar TSAye (incubação por 24h/37°C). O volume restante da suspensão de células de *L. monocytogenes* (8,9 ml) foi incubado por 1 hora a 25 °C (exceto para condição de BHI refrigerado que foi incubado a 5°C). Decorrida a incubação, foi realizada novamente a enumeração de *L. monocytogenes* em placas de TSAye. O restante da suspensão foi centrifugado novamente e o *pellet* foi utilizado para extração total do RNA.

A extração do RNA, seguida do tratamento com DNase, foi realizada conforme instruções do kit Ambion Ribo-Pure Bacteria kit (Ambion, EUA). Brevemente, as células de *L. monocytogenes* foram rompidas e em seguida foi realizado a purificação inicial do RNA, utilizando pérolas de zircônia. A purificação final foi feita em cartucho de filtração, com lavagens sucessivas e após esta etapa, foi feito tratamento com DNase. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C.

O RNA total de cada amostra foi quantificado e avaliado quanto ao grau de pureza em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, EUA). As medidas da

absorbância foram obtidas em comprimentos de onda de 260 e 280nm, e a razão igual a 1,8 indicava a boa qualidade da amostra. Para as quantificações foi considerado que 40ng de RNA por microlitro fornecia densidade ótica de 1,0 a 260nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Para verificar a integridade das amostras de RNA, foi realizado, eletroforese em gel de agarose 1,2% (p/v) em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) (Invitrogen, EUA) preparado com água tratada DEPC (Sigma-Aldrich, EUA). Foi utilizado fonte FB 200 (Fisher Scientific, EUA) durante 2 horas a uma corrente elétrica de 1,81A a 80V. Após a eletroforese, o gel de agarose foi corado com 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Synth, Brasil) e em seguida, observado em transiluminador ultravioleta para fotodocumentação (MiniBis UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel). A presença de duas bandas dos RNAs ribossomais 16S e 23S indicam a integridade da amostra de RNA (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Após verificar a qualidade e concentrações, todas as amostras de RNA foram diluídas a uma concentração de 100ng/µL e em seguida foi realizada a conversão do RNA em cDNA conforme indicado no kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription contendo inibidor de RNase (4374966, Applied Biosystems, EUA). As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C até a realização da PCR.

O cDNA foi utilizado para a realização da PCR em tempo real, para a quantificação da expressão do gene *InlA*, utilizando *primers* para os genes *16S rRNA* e *rpoB* como controles endógenos (Tabela 4). O volume total da reação de 12,5µL foi composto de 2 µL de cDNA, 6,25µL da mistura de reação ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABGene, Reino Unido), 3 µL de água purificada (Milli-Q, Millipore, EUA) e 0,63 µL de cada *primer* a 5µM (*Reverse* e *Forward*) (Invitrogen, EUA) (concentração final de 0,25 µM na reação). O protocolo de amplificação consistiu de uma etapa inicial de 15 min a 95°C, seguida de 40 ciclos com desnaturação de 95°C por 2 segundos, anelamento a 55°C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 10 segundos. Os ensaios foram realizados considerando um limiar de detecção (“*threshold*”) de 0,014. Os valores de Ct (“*cycle threshold*”) correspondiam ao ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorria a intersecção com este limiar. As análises foram realizadas em triplicatas.

Tabela 4. Especificações dos *primers* utilizados para avaliação da expressão gênica em *L. monocytogenes*.

<i>Primer*</i>	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>rpoB-fwd</i>	CGTCGTCTTCGTTCTGTTGG	Veen, Abee, 2010
<i>rpoB-rev</i>	GTTACGAACACACGTTCC	Veen, Abee, 2010
<i>16S-rRNA-fwd</i>	GATGCATAGCCGACCTGAGA	Veen, Abee, 2010
<i>16S-rRNA-rev</i>	TGCTCCGTCAGACTTTTCGTC	Veen, Abee, 2010
<i>inlA-fwd</i>	GAACCAGCTAAGCCIGTAAAAG	Werbrouck et al., 2006
<i>inlA-rev</i>	CGCCIGTTTGGGCATCA	Werbrouck et al., 2006

**rpoB*=Subunidade β da RNA polimerase *16S-rRNA*= Componente da subunidade 30S dos ribossomos de procariotos *InlA*=Internalina A

Os valores de Ct foram utilizados para avaliar a expressão diferencial do gene *inlA* nas diferentes condições de incubação (tabela 2) e para isso foi calculado o $\Delta\Delta CT$. A avaliação da expressão gênica foi obtida a partir da expressão $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, no qual QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial e ΔCT a diferença entre o CT da amostra amplificada para o gene alvo (*InlA*) e o CT da mesma amostra amplificada para o gene controle endógeno (*16S rRNA* e *rpoB*). Finalmente o $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra de interesse (com tratamento, tabela 2) e o ΔCT da amostra de referência - calibrador (sem tratamento, somente caldo BHI) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para fazer a comparação dos grupos, os valores de Ct obtidos foram normalizados e calibrados, conforme as fórmulas abaixo:

1) Normalização: $Ct_{(\text{gene alvo-InlA})} - Ct_{(\text{controle endógeno-16S rRNA})} = \Delta Ct$

2) Calibração: $\Delta Ct_{(\text{condição estresse-ex. bacteriocina})} - \Delta Ct_{(\text{sem condição estresse-BHI})} = \Delta\Delta Ct$

Em seguida foram avaliados quanto ao nível de expressão gênica pela fórmula:

$$QR (\text{nível expressão gênica}) = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Os valores da expressão gênica (unidades arbitrárias) de cada isolado obtido após tratamento em diferentes condições foram convertidos em porcentagens,

considerando que o valor encontrado para o mesmo isolado em presença de BHI como 100%.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com os valores das triplicatas independentes de cada ensaio, correlacionando o perfil dos isolados de *L. monocytogenes* em cada condição estudada. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnet com o nível de significância de 5%. A análise estatística dos dados e a confecção dos gráficos foram efetuadas por meio do software Graph Pad Prisma 5, EUA.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da formação de biofilmes em diferentes condições que mimetizam o trato gastrintestinal e alimentos

Neste trabalho foi observado o perfil de formação de biofilmes de 10 isolados de *L. monocytogenes* de diferentes origens em condições que mimetizam o trato gastrintestinal e alimentos, em placa de microtitulação com a quantificação de biomassa por coloração com cristal violeta.

Os resultados dos ensaios revelaram que os 10 isolados de *L. monocytogenes* testados apresentaram diferentes valores de densidade ótica (DO) em 595nm (0,72-1,33) quando cultivados em caldo BHI 37°C/24h. Contudo, todos os isolados foram considerados fracos formadores de biofilmes e os isolados provenientes de alimentos (L.m. H-2 e L.m. FCF 11) apresentaram maiores taxas de adesão que os outros isolados ($P<0,05$). Isso sugere uma possível relação entre a fonte de isolamento de *L. monocytogenes* e a capacidade da formação de biofilmes (Figura 3A).

Em caldo BHI suplementado com NaCl 5%, foram encontradas DO que variaram de 0,71 a 1,0 (Figura 3B). Nesta condição, L.m. HU 533 apresentou a maior DO, seguida do isolado L.m. H-2 ($P<0,05$).

L. monocytogenes também foi fraca formadora de biofilme quando cultivada em caldo BHI suplementado com sacarose 2%. Os isolados L.m. H-2 e L.m. FCF 11 apresentaram redução significativa na formação de biofilmes nesta condição ($P<0,05$) quando comparado com caldo BHI. Apesar disso, L.m. FCF 11 apresentou a maior densidade ótica entre todos os isolados (0,92) (Figura 3C).

Em presença de Oxgall 0,3%, os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram DO de 0,80 a 1,20 (Figura 3D). Nesta condição, L.m. INCQS 327, L.m. Reg 26c e L.m. FCF 4 apresentaram aumento significativo ($P<0,05$) na formação de biofilmes. Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram valores bastante diferentes entre si, demonstrando que o potencial de Oxgall influenciar a adesão do patógeno em placa de microtitulação é cepa dependente e pode estar relacionado com a capacidade de cada isolado se multiplicar nesta condição, como demonstrado no Apêndice A - Tabela 1.

Para a adesão em placas de microtitulação com caldo BHI pH 4,5 foram observados valores de DO entre 0,74 e 0,88. Os isolados L.m. H-2 e L.m. FCF 11

foram os únicos a apresentarem redução significativa em comparação com o controle em caldo BHI ($P < 0,05$) (Figura 3E).

Na avaliação da adesão dos isolados de *L. monocytogenes* quando cultivados em caldo BHI incubados por 72h/5°C foram encontrados valores reduzidos de DO, entre 0,67 e 0,71; talvez devido o fato de que a capacidade de multiplicação dos isolados nesta condição esteja um pouco reduzida se comparado com o cultivo em caldo BHI (Apêndice A, Tabela 1). Nesta condição, todos os isolados foram considerados fracos formadores de biofilmes e a análise estatística demonstrou que L.m. Vi-1, L.m. INCQS 327 e L.m. INCQS 353 não diferiram do controle (Figura 3F).

Na figura 3G estão ilustrados os resultados dos experimentos de adesão para os isolados de *L. monocytogenes* cultivados em caldo BHI adicionado de preparação contendo bacteriocina de *E. faecium* 130 (3.200UA/mL). Foram encontradas DO de 0,69 a 0,78 com diferenças estatísticas para os isolados L.m. HU533, L. m. H-2, L. m. FCF 11, L.m. FCF 4 e L.m. INCQS 353.

Foi observada também a redução significativa para adesão de L. m. H-2, L.m. FCF 11, L.m. Reg 26c e L.m. FCF 4 quando cultivadas em caldo BHI adicionado de preparação contendo bacteriocina de *L. mesenteroides* A11 (12.800 UA/mL) com DO entre 0,70 e 0,75 (Figura 3H). Em presença do caldo BHI adicionado de preparação contendo bacteriocina de *L. sakei* 1 (400UA/mL) foram observadas DO entre 0,72 e 0,78 (Figura 3I). Nesta condição, os isolados que apresentaram diferença estatística em comparação com os resultados do cultivo em caldo BHI foram L.m. HU533, L.m. H-2, L.m. FCF 11, L.m. FCF 4 e L.m. INCQS 353.

Os resultados demonstraram que a presença do filtrado obtido a partir de culturas bacteriocinogênicas tem a capacidade de influenciar a formação de biofilmes, entretanto, não foram observadas diferenças nas contagens em placa das culturas dos isolados nestas condições, em comparação com a contagem em caldo BHI (Apêndice A, Tabela 1).

Figura 3. Perfis de adesão dos isolados de *L. monocytogenes* por meio da quantificação espectrofotométrica (595nm) do corante cristal violeta associado às células bacterianas aderidas a placa de microtitulação quando cultivadas: **A)** caldo BHI por 24h/37°C, **B)** caldo BHI suplementado com cloreto de sódio 5% por 24h/37°C, **C)** caldo BHI suplementado com sacarose 2% por 24h/37°C, **D)** caldo BHI suplementado com Oxgall 0,3% por 24h/37°C, **E)** caldo BHI suplementado com ácido clorídrico (pH4,5) por 24h/37°C **F)** caldo BHI por 72h/5°C, **G)** em caldo BHI suplementado filtrado obtido da cultura de *E. faecium* 130 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C **H)** em caldo BHI suplementado com filtrado da cultura de *L. mesenteroides* A11 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C **I)** em caldo BHI suplementado com sobrenadante de cultura de *L. sakei* 1 produtor de bacteriocina (50%v/v) por 24h/37°C.

4.2. Avaliação da capacidade de adesão e invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes* em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos e em presença de preparações semi-purificadas contendo bacteriocinas

A capacidade de adesão e invasão de *L. monocytogenes* foi bastante variada entre os isolados cultivados em caldo BHI 24h/37°C, apesar dos inóculos utilizados terem sido semelhantes tanto para o ensaio de adesão quanto para o de invasão (Apêndice B, Tabela 2 e 4). A maior taxa de adesão foi obtida para o isolado L.m. HU 533 (77±8%), enquanto que o isolado L.m. H-2 apresentou maior taxa de invasão (60±5%), com uma variação de cerca de 13 % na adesão e de 23 % na invasão (tabela 5 e tabela 6).

Neste estudo, também foi avaliado o potencial de NaCl 5% influenciar a adesão e invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2. Os valores das porcentagens de adesão variaram entre 79±3% e 65±2% (tabela 5), sendo que o isolado L.m. HU471 apresentou o maior valor. No ensaio de invasão (tabela 6) o isolado L.m. H-2 apresentou a maior porcentagem (59±1%) em comparação com os isolados estudados nesta condição. Foram observados aumentos significativos apenas na adesão de L.m. ATTC 19115 e na invasão L. m. INCQS 353 e L. m. Reg. 26c, se comparado com os valores obtidos em caldo BHI ($P < 0,05$).

Em presença de sacarose 2 % foram obtidas porcentagens de adesão dos isolados de *L. monocytogenes* compreendidas entre 81±9% e 58±2% (tabela 5), sendo encontrada a maior taxa de adesão para o isolado L.m. Reg. 26C. No ensaio de invasão foi observada a maior taxa de invasão para o isolado L. m. H-2 (53±1%), mas, o único isolado que apresentou diferença estatística se comparado com o ensaio em caldo BHI (controle) foi L.m. FCF 4 ($P < 0,05$).

No ensaio de adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 em presença de Oxgall 0,3 % foram obtidas contagens menores que os controles (abaixo do limite de quantificação, ou seja, estimadas) para L.m. ATTC 19115, L.m. Vi-1, L.m.H-2, L.m. FCF 11, L.m. e INCQS 327. Entretanto, para L.m. FCF 4 houve um aumento na taxa de adesão as células Caco-2 ($P < 0,05$) em comparação com o controle para a mesma cepa, em caldo BHI. No ensaio de invasão em presença de Oxgall 0,3% todos os isolados foram inibidos ($P < 0,05$) (tabela 6). As contagens do inóculo inicial de isolados de *L. monocytogenes* nesta condição foram relativamente baixas para o processo de infecção de células Caco-2 por *L. monocytogenes*, como demonstrado no Apêndice B, tabelas 4 e 5.

Em pH ácido (pH 4,5) a maior taxa de adesão encontrada entre os isolados foi para L.m. INCQS 327 (64±8%) (tabela 5). Quase todos os isolados apresentaram uma redução significativa nas taxas de adesão ($P < 0,05$), exceto para L.m. FCF 4 e

L.m. INCQS 353. Entretanto, para o ensaio de invasão, houve inibição de todos os isolados de *L. monocytogenes* ($P<0,05$) (tabela 6).

A incubação prévia de *L. monocytogenes* a 5°C/72h resultou em uma maior taxa de adesão para o isolado de origem ambiental L.m. Reg. 26c ($75\pm10\%$) (tabela 5). Contudo, não foi observada diferença estatística deste isolado se comparado com os resultados obtidos em caldo BHI. Nesta mesma condição, L.m. INCQS 353 aumentou significativamente a adesão às células Caco-2, enquanto que os isolados L.m. HU 533, L.m. Vi-1, L.m.H-2, L.m. INCQS 327 tiveram uma redução significativa da adesão (tabela 5). No ensaio de invasão houve inibição de todos os isolados de *L. monocytogenes* (tabela 6) ($P<0,05$).

No presente trabalho, também foram avaliadas as capacidades de invasão e adesão por isolados de *L. monocytogenes* a células Caco-2 após cultivo em caldo BHI contendo bacteriocinas semi-purificadas de *E. faecium* 130 (3.200UA/mL), *L. mesenteroides* A11 (12.800 UA/mL) e *L. sakei* 1 (400UA/mL).

Na presença de extrato semi-purificado contendo a bacteriocina de *E. faecium* 130 foram encontraram porcentagens de adesão entre $74\pm4\%$ e $59\pm2\%$, sendo que esses valores não foram significativamente diferentes, em comparação com os valores encontrados para caldo BHI (tabela 5). Para o ensaio de invasão, L.m. H-2 apresentou o maior valor nesta condição, mas não diferiu do controle, enquanto que L.m. FCF 4 foi o único isolado com resultado significativamente diferente do controle, apresentando redução da taxa de invasão (tabela 6).

A maior porcentagem encontrada para a adesão de *L. monocytogenes* cultivada em presença de bacteriocina de *L. mesenteroides* A11 foi para o isolado L.m. INCQS 327 ($76\pm3\%$) (tabela 5). A análise estatística para todos os valores da adesão nesta condição demonstrou não haver diferença com relação aos resultados encontrados para o controle em caldo BHI (controle). O isolado L.m. H-2 foi o mais invasivo entre todos os isolados ($48\pm6\%$), mas houve uma redução significativa da taxa de invasão na presença de preparação contendo bacteriocina de *L. mesenteroides* A11, se comparado com ensaio em caldo BHI.

Na presença de bacteriocina de *L. sakei* 1, a maior taxa de adesão entre os isolados foi obtida para o isolado L.m. HU 533 ($73,5\pm2,5\%$). Contudo, uma redução significativa em comparação com caldo BHI foi observada para o isolado L.m. H-2 ($58\pm1\%$) (tabela 5). Para os experimentos de invasão com bacteriocina de *L. sakei* 1, o isolado L.m. HU 471 apresentou um aumento significativo em sua taxa de invasão de células Caco-2 se comparado com o caldo BHI e o isolado L.m. H-2 continuou apresentando o maior potencial de invasão ($57\pm1\%$) se comparado com os outros isolados (tabela 6).

Tabela 5. Porcentagens de adesão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas em: caldo BHI, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	67 ± 1,5	72 ± 1,5 ^a	68 ± 1,5	*	55 ± 3,0 ^a	70,5 ± 4,0	70 ± 1,0	65,5 ± 3,0	68 ± 4,0
L.m. HU 471	73 ± 2,0	79 ± 3,0	71 ± 1,0	68 ± 8	59 ± 3,5 ^a	72 ± 7,3	72,4 ± 1,0	69 ± 8,0	71 ± 5,0
L.m. HU 533	77 ± 8,0	73 ± 2,0	67,5 ± 3,0	69 ± 7	53 ± 9,0 ^a	58 ± 13,0 ^a	74 ± 4,0	71 ± 0,5	73,5 ± 2,5
L.m. Vi-1	74 ± 1,0	71 ± 2,0	71 ± 1,5	*	60 ± 3,5 ^a	63 ± 5,5 ^a	66 ± 2,0	67 ± 4,5	67 ± 3,0
L.m. H-2	73 ± 5,0	70 ± 4,0	72 ± 2,0	*	51 ± 7,0 ^a	61 ± 6,0 ^a	69 ± 3,0	68 ± 2,5	58 ± 1,0 ^a
L.m. FCF 11	73 ± 1,0	73 ± 2,0	72 ± 1,0	*	56 ± 4,0 ^a	71 ± 8,0	71 ± 1,0	71 ± 1,0	72 ± 1,0
L.m. INCQS 327	76 ± 1,0	73 ± 2,0	72 ± 3,0	*	64 ± 8,0 ^a	57 ± 0,1 ^a	69 ± 2,0	76 ± 2,5	66 ± 2,0
L.m. INCQS 353	64 ± 1,0	65 ± 2,0	58 ± 1,5	62 ± 1,5	54 ± 13,0	71 ± 4,0 ^a	59 ± 2,0	60 ± 3,0	57 ± 4,0
L.m. Reg. 26c	73 ± 1,0	74 ± 5,0	81 ± 8,5	74 ± 2,0	58 ± 3,0 ^a	75 ± 10,0	69 ± 1,0	71 ± 0,5	70 ± 2,5
L.m. FCF 4	70 ± 3,0	70 ± 4,0	80 ± 7,0	87 ± 6,0 ^a	61 ± 16,0	60 ± 14,0	74 ± 2,0	73 ± 2,0	72 ± 1,0

*Contagens abaixo do limite de quantificação do método (30 UFC/placa).

^a Letra “a” indica resultados com diferença significativa em comparação com os encontrados para *L. monocytogenes* incubado em caldo BHI.

Tabela 6. Porcentagens de invasão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas em: caldo BHI, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	50 ± 5,5	48 ± 5,0	49 ± 3,0	**	**	*	46 ± 2,0	45 ± 5,0	44 ± 2,0
L.m. HU 471	39 ± 4,0	43 ± 4,0	42 ± 2,0	**	*	*	37 ± 9,0	36 ± 7,0	50 ± 1,0 ^a
L.m. HU 533	39 ± 4,0	39 ± 2,0	42 ± 2,0	*	*	**	42 ± 3,0	42 ± 6,0	36 ± 2,0
L.m. Vi-1	46 ± 5,0	49 ± 11,0	40 ± 7,0	**	**	*	43 ± 9,0	41 ± 1,0	43 ± 5,0
L.m. H-2	60 ± 5,0	59 ± 1,0	53 ± 1,0	*	*	*	55 ± 1,0	48 ± 6,0 ^a	57 ± 1,0
L.m. FCF 11	45 ± 1,0	50 ± 10,0	45 ± 4,0	*	*	*	44 ± 3,0	41 ± 1,0	46 ± 2,0
L.m. INCQS 327	43 ± 7,0	40 ± 2,0	39 ± 7,0	**	**	*	45 ± 2,0	37 ± 8,0	47 ± 3,0
L.m. INCQS 353	37 ± 6,0	52 ± 6,0 ^a	34 ± 6,0	**	*	*	38 ± 7,0	37 ± 4,0	33 ± 3,0
L.m. Reg. 26c	43 ± 2,0	55 ± 5,0 ^a	41 ± 9,0	**	*	*	36 ± 3,0	41 ± 0,5	40 ± 4,0
L.m. FCF 4	50 ± 2,0	51 ± 9,0	39 ± 3,0 ^a	**	*	*	44 ± 1,0 ^a	42 ± 1,0 ^a	42 ± 1,0 ^a

*Contagens abaixo do limite de quantificação do método (30 UFC/placa)

**Contagens abaixo do limite de detecção do método (10 UFC/placa)

^a Letra “a” indica resultados com diferença significativa em comparação com os encontrados para *L. monocytogenes* incubado em caldo BHI

4.3. Avaliação da capacidade de adesão e invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes* em co-cultura com bactérias lácticas

A maior porcentagem de adesão entre os isolados de *L. monocytogenes* co-cultivada em presença de *E. faecium* 130 foi observada para o isolado L.m. Reg. 26C (59±6%). Nesta condição, todos os isolados tiveram resultados de adesão estatisticamente diferentes se comparados com os valores em caldo BHI, exceto L.m. INCQS 353 (tabela 7). *E. faecium* 130 inibiu a invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes* apresentando populações abaixo do limite de quantificação (< 30 UFC/placa).

Na presença de *L. mesenteroides* A11, todos os isolados diminuíram significativamente a capacidade de adesão a células Caco-2 (exceto L.m. ATCC 19115, 64±5%) quando comparados com os controles (adesão sem co-cultivo) (tabela 7). Para o ensaio de invasão, somente os isolados L.m. ATCC 19115, L.m. HU 471, e L. m. Reg 26C não reduziram suas taxas de internalização em células Caco-2 quando cultivados em presença de *L. mesenteroides* A11, em comparação com o caldo BHI ($P>0,05$)(tabela 8).

No ensaio de adesão em co-cultura com *L. sakei* 1, o único isolado estatisticamente diferente do caldo BHI controle foi L.m. Vi-1 ($P<0,05$) (tabela 7) Para o ensaio de invasão nesta condição, os isolados L.m. INCQS 353 e L.m. FCF 4 foram estatisticamente menores se comparados com o resultado em caldo BHI ($P<0,05$) (tabela 8).

Tabela 7. Porcentagens de adesão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas em co-cultura com *L. sakei* 1, *L. mesenteroides* A11 e *E. faecium* 130.

	BHI	Co-cultura com <i>E. faecium</i> 130	Co-cultura com <i>L. mesenteroides</i> A 11	Co-cultura com <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	67 ± 1,5	54 ± 3*	64± 5	69 ± 1
L.m. HU 471	73 ± 2,0	44,5 ± 1*	58 ± 3*	79± 4
L.m. HU 533	77± 8,0	46± 1*	57± 2*	71± 2
L.m. Vi-1	74± 1,0	50± 6*	57± 1*	63± 2*
L.m. H-2	73± 5,0	48± 1*	55± 2*	67± 2
L.m. FCF 11	73± 1,0	42± 2*	46± 8*	68± 2
L.m. INCQS 327	76± 1,0	51± 7*	49± 6*	65± 4
L.m. INCQS 353	64± 1,0	55± 8	41± 4*	66± 3
L.m. Reg. 26c	73± 1,0	59± 6*	59± 3*	79± 2
L.m. FCF 4	70± 3,0	47± 5*	52± 5*	71± 2

*Indica resultados com diferença significativa quando comparado com os encontrados para *L. monocytogenes* incubado em caldo BHI

Tabela 8. Porcentagens de invasão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas em co-cultura com *L. sakei* 1, *L. mesenteroides* A11 e *E. faecium* 130.

	BHI	Co-cultura com <i>E. faecium</i> 130	Co-cultura com <i>L.</i> <i>mesenteroides</i> A 11	Co-cultura com <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	50 ± 5,5	§	39± 7	45 ± 5
L.m. HU 471	39 ± 4,0	§	33± 8	44± 4
L.m. HU 533	39± 4,0	§	§	47± 1
L.m. Vi-1	46± 5,0	§	§	34± 4
L.m. H-2	60± 5,0	§	41± 8*	47± 7
L.m. FCF 11	45± 1,0	§	37± 6*	47± 2
L.m. INCQS 327	43± 7,0	§	§	32± 4
L.m. INCQS 353	37± 6,0	§	§	§
L.m. Reg. 26c	43± 2,0	§	39± 3	46± 6
L.m. FCF 4	50± 2,0	§	§	33± 4*

*Indica resultados com diferença significativa quando comparado com os encontrados para *L. monocytogenes* incubado em caldo BHI

§Não foi possível calcular a % de invasão porque foram encontradas populações estimadas de *L. monocytogenes* (< 30 UFC/placa),

A capacidade de adesão às células Caco-2 por *L. monocytogenes* em co-cultivo com *L. sakei* 1, *L. mesenteroides* A11 ou *E. faecium* 130 também foi visualizada por meio da técnica de hibridação *in situ* por fluorescência. A técnica foi primeiramente padronizada em cultura pura para se observar a qualidade e capacidade de coloração das sondas. O controle para a técnica com sonda NON338-não específica para bactérias, demonstrou ausência de resultados falsos positivos quando testadas com *L. monocytogenes* ATTC19115, *E. faecium* 130, *L. sakei* 1 e *L. mesenteroides* A11. A sonda utilizada como controle positivo (EUB338-uso geral para bactérias) e as sondas específicas para *Listeria* spp. (Lis-1400), *Leuconostoc* spp. (LU2), *Lactobacillus* spp. (Lab158) e *Enterococcus* spp. (Enc221) não apresentaram coloração cruzada entre as diferenças espécies e sondas. Além disso, foi demonstrada a eficiência das sondas em corar todas as células bacterianas presentes no esfregaço conforme a especificidade, por meio da visualização microscópica do mesmo campo, claro e com fluorescência.

As figuras 4, 5 e 6 ilustram o efeito de *L. sakei* 1, *L. mesenteroides* A11 e *E. faecium* 130 (corados em verde) em inibir a adesão de *L. monocytogenes* (corada em vermelho) às células Caco-2.

Figura 4. Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *L. sakei* 1 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul.

Figura 5. Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *L. mesenteroides* A11 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul.

Figura 6. Fotomicrografia da adesão bacteriana as células Caco-2 por meio da técnica de FISH observadas em microscópio de fluorescência (aumento 1000x): *L. monocytogenes* ATCC 19115 em vermelho, *E. faecium* 130 em verde e núcleo da célula Caco-2 em azul.

4.4. Avaliação da expressão do gene *InIA* de *L. monocytogenes* em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, em alimentos e em presença de bacteriocinas por meio da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR).

O RNA extraído nesta etapa do trabalho foi quantificado por espectrofotometria e a razão obtida entre as leituras em comprimentos de onda de 260nm e 280nm ficou acima de 1,8, indicando pureza adequada da preparação. A realização da eletroforese em gel de agarose também confirmou a integridade e a boa qualidade do RNA coletado. A figura 7 ilustra perfil das amostras do RNA de isolados de *L. monocytogenes* tratados com extrato semi-purificado da cultura de *L. sakei* 1 produtor de bacteriocina. A eletroforese em gel de agarose foi realizada para todas as outras condições e foi confirmada a boa qualidade dos RNAs extraídos (dado não mostrado).

Figura 7. Fotomicrografia de gel de agarose em tampão TBE prepadado com água DEPC demonstrando a qualidade do RNA extraído de *L. monocytogenes* tratadas por uma hora com extrato semi-purificado da cultura de *L. sakei* 1 produtor de bacteriocina: M) marcador de 1kb 1) L.m. ATTC 19115, 2) L.m. HU 533 3) L.m. HU 471 4) L.m. Vi-1 5) L.m. H-2 6) L.m. FCF 11, 7) L.m. FCF 4, 8) L.m. Reg. 26c, 9) L.m. INCQS 327, 10) L.m. INCQS 353. As bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 18S e 28S estão indicadas na figura.

Com os *primers* para os genes *rpoB*, *16S rRNA* e *InIA* foi obtida a amplificação do cDNA de *L. monocytogenes*, e as temperaturas de dissociação dos *amplicons* foram respectivamente, 78,3 °C, 84,6°C e 76,8 °C. Os *amplicons* foram analisados por eletroforese em gel de agarose e foi demonstrado que não houve

formação de produtos inespecíficos nas condições utilizadas para a reação de PCR em tempo real (dados não mostrados).

Após a realização da PCR em tempo real de todas as amostras de cDNA, os valores de Ct obtidos foram convertidos em ΔCt (tabela 9) e em seguida transformados para valores reais da expressão gênica expressos em unidades arbitrárias (Tabela 10). Os valores encontrados foram transformados em porcentagens, sendo considerando 100% o resultado para o mesmo isolado em caldo BHI (sem nenhum tratamento de estresse).

Os resultados da enumeração no tempo zero (T_0) e após exposição ao fator de estresse (T_1) indicaram que para todas as condições estudadas, as populações de *L. monocytogenes* eram semelhantes quantitativamente e que os resultados dos experimentos de quantificação de RNAr deveriam refletir alterações de expressão gênica diferencial para o mesmo número de células (Apêndice C, Tabela 6 e 7).

A adição de NaCl a 5% reduziu significativamente a expressão do gene *inlA* dos isolados L.m. ATCC19115, L.m. HU 471, L.m. Vi-1 e L.m. INCQS 353 ($P < 0,05$). A presença de sacarose 2% também influenciou a expressão do gene *inl A* dos isolados L.m. HU 471, L.m. Vi-1 e L.m. INCQS 353 ($P < 0,05$). Surpreendentemente, para o isolado L.m. HU 471, a expressão do gene *inlA* foi oito vezes maior na presença de sacarose, quando comparada com a incubação realizada em caldo BHI. Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram níveis reduzidos da expressão do gene *inl A* na presença de 0,3% Ovgall (exceto L.m. INCQS 353), na incubação a 5°C (exceto L.m. FCF 11) e em pH 4,5 ($P < 0,05$).

Os resultados da expressão gênica representados nas tabelas 9 e 10, também demonstraram que todos os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram níveis significativamente reduzidos ($P < 0,05$) na expressão do gene *inlA* em presença de preparações semi-purificadas de bacteriocinas de *L. sakei* 1, *L. mesenteroides* A11 e *E. faecium* 130 (exceto L.m. INCQS 353).

Tabela 9. Valores de ΔC_t utilizados para avaliação da expressão gênica de *inlA* em *L. monocytogenes* quando incubados em caldo BHI suplementado com: NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), caldo BHI 5°C, extratos semi-purificado obtidos da cultura de *L. sakei* 1, extratos semi-purificado obtidos da cultura de *L. mesenteroides* A11 e extratos semi-purificado obtidos da cultura de *E. faecium* 130.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	4,48±0,74	11,75±2,03*	7,81±2,31	15,37±2,34*	17,49±1,51*	20,45±3,06*	14,90±0,94*	15,87±0,67*	14,33±0,71*
L.m. HU 533	9,58±1,12	12,22±0,96	10,54±0,54	13,75±2,08*	18,41±2,18*	15,82±0,90*	17,35±0,30*	18,08±0,72*	15,95±0,67*
L.m. HU 471	11,54±0,34	11,97±0,70*	8,50±0,35*	13,48±0,70*	17,77±0,85*	17,59±0,11*	17,77±0,38*	18,27±0,16*	15,19±0,14*
L.m. Vi-1	10,23±0,36	13,14±0,17*	13,22±0,54*	15,88±0,93*	19,27±0,86*	18,24±0,29*	18,70±0,61*	18,70±1,00*	17,35±0,56*
L.m. H-2	8,85±0,83	9,93±0,84	10,82±0,82	15,53±1,32*	12,99±0,11*	16,80±0,58*	16,97±1,35*	15,11±1,61*	13,25±2,09*
L.m. FCF 11	6,86±0,87	7,42±0,29	10,60±1,24	13,19±1,09*	19,34±2,36*	10,56±0,75	15,65±0,97*	14,73±1,43*	14,41±4,17*
L.m. INCQS 327	8,74±0,68	7,01±1,31	8,34±0,38	12,15±0,22*	14,35±1,24*	18,69±0,58*	14,32±1,25*	12,33±0,70*	11,30±0,77*
L.m. INCQS 353	11,88±0,79	13,91±0,87*	14,99±0,16*	17,52±0,38	13,11±1,46*	18,99±1,17*	16,53±0,39	16,57±0,56*	12,19±0,67*
L.m. Reg. 26c	6,42±0,11	6,07±0,46	6,76±0,45	14,78±0,65*	16,60±1,33*	15,70±0,09*	16,23±0,56*	14,46±1,11*	14,54±0,47*
L.m. FCF 4	9,66±0,11	8,72±0,75	11,11±0,28	14,08±0,46*	16,09±1,07*	17,90±0,11*	16,49±0,43*	16,26±0,29*	15,59±1,31*

*Indica resultados em que o ΔC_t foi significativamente diferente da condição controle - caldo BHI ($P < 0,05$).

Tabela 10. Porcentagem do nível de expressão do gene *inlA* em caldo BHI suplementado com: NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), caldo BHI 5°C, extratos semi-purificado obtidos da cultura de *L. sakei* 1, extratos semi-purificado obtidos da cultura de *L. mesenteroides* A11 e extratos semi-purificado obtidos da cultura de *E. faecium* 130.

Isolados	Condições								
	BHI ^a	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	100,00	1,23	22,61	0,02	0,12	0,01	0,11	0,04	0,08
L.m. HU 471	100,00	80,73	819,91	1,53	28,35	1,47	7,75	0,92	1,33
L.m. HU 533	100,00	12,96	38,17	0,34	12,39	1,05	0,88	0,20	0,31
L.m. Vi-1	100,00	13,04	13,10	0,22	2,36	0,38	0,75	0,34	0,30
L.m. H-2	100,00	47,39	25,51	4,87	1,20	0,37	9,08	1,88	0,45
L.m. FCF 11	100,00	58,50	8,81	0,04	1,36	7,4	4,08	0,55	0,24
L.m. INCQS 327	100,00	113,42	32,23	0,67	2,24	0,03	4,59	2,19	0,69
L.m. INCQS 353	100,00	25,17	10,10	52,2	1,79	0,84	77,68	3,60	3,56
L.m. Reg, 26c	100,00	216,67	37,06	1,49	4,88	0,33	2,36	1,05	0,91
L.m. FCF 4	100,00	133,69	82,78	0,13	0,33	0,16	0,38	0,50	0,12

^a O nível de expressão de cada isolado na condição controle (caldo BHI, pH 7,0) foi considerada como 100%.

Discussão

5. DISCUSSÃO

5.1. Formação de biofilmes em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal e alimentos

O processo de adesão a superfícies inertes envolve vários fatores como força de van der Waals e eletrostáticas, além de interações hidrofóbicas. A adesão bacteriana também depende de estruturas moleculares específicas da superfície da célula, como os flagelos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; DUNNE, 2002; PAN et al., 2006; TRESSE et al., 2007). Algumas condições como temperatura, pH e fase de crescimento também podem influenciar a capacidade de *L. monocytogenes* em aderir a superfícies inertes (BELESSI et al., 2011; CALY et al., 2009; TRESSE et al., 2007).

Diferentes isolados de *L. monocytogenes* podem apresentar perfis variados de adesão a superfícies inertes (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002; HARVEY; KEENAN; GILMOUR, 2007). Conforme a classificação de Stepanovic et al. (2000) todos os isolados deste trabalho foram classificados como fracos formadores de biofilmes, pois a DO encontrada para as amostras era menor que o dobro da DO do controle negativo no ensaio de quantificação de biomassa por cristal violeta.

Chae et al. (2006) avaliaram a adesão de 20 isolados de *L. monocytogenes*. Os autores confirmaram que os isolados associados a grandes surtos de origem alimentar eram melhores formadores de biofilmes do que isolados de casos esporádicos de listeriose. Por outro lado, Tresse et al. (2007) não observaram diferenças no perfil de adesão de *L. monocytogenes* isolada de casos esporádicos de listeriose e de grandes surtos, entretanto, os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de indústrias de alimentos apresentavam maior potencial de adesão a superfícies inertes, se comparado com os isolados de origem clínica.

Harvey, Keenan e Gilmour (2007), avaliaram a formação de biofilmes por 138 cepas de *L. monocytogenes* de origem clínica, alimentos e locais de processamento de alimentos, por meio de ensaio em placa de microtitulação com cristal violeta e revelaram que somente cerca de 1,5% das bactérias foram classificadas como fortes produtoras de biofilme, sendo todas isoladas de alimentos.

Em nosso laboratório, dentre os dez isolados de *L. monocytogenes* estudados, os dois (20%) que tiveram maior adesão, eram provenientes de

alimentos (L.m. IAL2 e L.m. FCF11) sugerindo uma possível correlação entre a fonte de isolamento e capacidade da formação de biofilmes.

O cloreto de sódio, utilizado nos alimentos para dar sabor e também para reduzir a multiplicação de bactérias, pode aumentar a capacidade de *L. monocytogenes* aderir a superfícies plásticas segundo Caly et al. (2009) e Jesen et al. (2007). Belessi et al. (2011) e Caly et al. (2009) demonstraram que a presença de NaCl em altas concentração (respectivamente 9,5% e 6%) não reduziu a adesão de isolados de *L. monocytogenes* em placa de microtitulação corados com cristal violeta e até mesmo aumentou a adesão em algumas condições. Resultados deste trabalho, quando foi avaliada a formação de biofilmes em presença de NaCl 5% revelaram um aumento da adesão para L.m. HU 533, se comparado com a DO em caldo BHI. Nossos resultados corroboram com os outros autores que relataram alteração da adesão na presença de NaCl, enquanto que para os outros isolados houve pouca alteração.

Em estudo realizado por Moretro et al. (2003), em presença de glicose foi observada maior capacidade de formação de biofilmes para todas as sete cepas de *Staphylococcus* sp. analisadas, enquanto que a presença de NaCl estimulou a formação de biofilmes de quatro cepas das estudadas. Aqueles autores sugeriram que houve influência da presença dos solutos na expressão de genes relacionados com a formação de biofilmes. Kawarai et al. (2009) também demonstraram que cepas de *Escherichia coli* eram capazes de sobreviver e formar biofilmes em meio hipertônico contendo sacarose. No presente estudo, foi observada a redução na formação do biofilme em presença da sacarose 2% para apenas dois isolados (L.m. H-2 e L.m. FCF 11).

Os isolados L.m. H-2 e L.m. FCF 11 apresentaram menor adesão a superfície de poliestireno (microplacas) em pH 4,5. Tresse et al. (2007) avaliaram a adesão de isolados de *L. monocytogenes* em pH 5 e pH 7 e os resultados daquele estudo demonstraram que apesar de *L. monocytogenes* se multiplicar em pH 5, sua capacidade de adesão a superfícies inertes foi bem menor se comparada com pH7, sugerindo que as barreiras empregadas para conservação de alimentos, como pH ácido, podem também desfavorecer a formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

A natureza psicotrófica de *L. monocytogenes* é bem reconhecida, mas há poucos relatos sobre estudos de formação de biofilme sob refrigeração (CHAN; WIEDMANN, 2009; CHATURONGAKUL et al., 2008; TIGANITAS et al., 2009).

Nilsson et al. (2011) relataram que não houve formação de biofilme por *L. monocytogenes* antes da incubação de 120h a 10°C em ensaio de microplaca corada com cristal violeta. Neste trabalho, foi quantificada a adesão de isolados de *L. monocytogenes* quando cultivados em caldo BHI por 72h/5°C e para a maioria dos isolados (exceto L.m. Vi-1, L.m. INCQS 327 e L.m. INCQS 353) houve menor biomassa em biofilme se comparado com os do caldo BHI. Por isso, pode ser de importância a avaliação da adesão de *L. monocytogenes* sob refrigeração por um tempo de incubação maior.

Em presença de Oxgall 0,3% todos os isolados foram considerados fracos formadores de biofilmes e não foi observada correlação entre a origem do isolado e maior capacidade de adesão a superfícies inertes. Nesta condição, L.m. INCQS 327, L.m. Reg 26c e L.m. FCF 4 apresentaram aumento significativo na formação de biofilmes e resultados similares foram encontrados por Pumbwe et al. (2007) ao avaliar a formação de biofilmes de *Bacteroides fragilis* em presença de sais biliares.

Foram obtidos menores valores de DO para incubação na presença de preparação contendo bacteriocinas de *E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A11 *L. sakei* 1, em comparação com o controle (BHI). Outros trabalhos também demonstraram a atividade antilisteriana de algumas bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas e seu potencial uso no controle de contaminação por patógenos em alimentos e formação de biofilmes (AMMOR et al., 2006; GHRAIRI et al., 2008; MINEI et al., 2008; TRIAS et al., 2008; WINKELSTROTER et al., 2011; ZHAO; DOYLE; ZHAO, 2004).

5.2. Invasão e adesão de células Caco-2 por *L. monocytogenes* em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos, em de preparações contendo bacteriocinas e em co-cultivo com bactérias ácidas lácticas

Muitos trabalhos têm utilizado cultura de células para determinar diferenças no potencial virulento de cepas de *L. monocytogenes* e tem sido demonstrado que a invasividade de *L. monocytogenes* pode estar relacionada com a virulência de cada cepa e com as condições encontradas no ambiente (OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009; KUSHWAHA; MURIANA, 2010; WERBROUCK, et al., 2009). Dentre estas condições, aquelas encontradas nos alimentos e no hospedeiro parecem influenciar a expressão dos genes de virulência, resultando em um perfil

variado de infectividade entre os isolados (BUENO et al., 2010; JARADAT; BHUNIA, 2003).

Bueno et al. (2010) avaliaram a invasão em células Caco-2 por 30 isolados de *L. monocytogenes* de diferentes origens e demonstraram uma grande variação, independentemente da sua origem. Naquele trabalho também foi observado que a média de invasão dos isolados de origem humana (9,31%) foi maior que a média encontrada para de alimentos (3,75%). Entretanto, Werbrouck et al. (2006) avaliaram a invasividade de 64 isolados de *L. monocytogenes*, sendo 26 de origem clínica e 38 de origem não clínica, e demonstraram que as cepas de origem clínica tinham menor capacidade de invasão em células intestinais Caco-2 e células hepáticas HepG2 do que as cepas de origem não clínica. Naquele estudo, também foram avaliados os níveis de RNA mensageiro para os genes *inl A* e *inl B*, relacionados com o processo de invasão por *L. monocytogenes*, e foi constatada uma menor expressão destes genes em isolados de origem clínica.

Altas concentrações de NaCl podem regular respostas ao estresse e modificar a expressão de fatores de virulência (JESEN et al., 2008; GARNER et al., 2006). Neste trabalho, a presença de NaCl em caldo BHI causou um aumento significativo na adesão de *L.m* ATTC 19115 e na invasão *L. m.* INCQS 353 e *L. m.* Reg. 26c, enquanto que outros isolados não foram afetados pela presença do NaCl. Estes resultados concordam parcialmente com Garner et al. (2006) quando avaliaram a capacidade de invasão por *L. monocytogenes* previamente incubadas com altas concentrações de NaCl a 37°C e em pH 7,4. Naquele estudo, foi demonstrado que *L. monocytogenes* possuía uma maior invasividade na presença de NaCl se comparado com a incubação em BHI sem NaCl com mesmo pH e temperatura. Há relato de que este fato se deve ao aumento da expressão do gene *inl A* em *L. monocytogenes* (SUE et al., 2004), contudo, Jensen et al. (2008) e Galdiero, D'Isanto e Aliberti (1997) não observaram diferenças significativas no potencial de invasão e adesão em células Caco-2 por *L. monocytogenes* previamente cultivadas com e sem a presença de NaCl.

A tolerância de *L. monocytogenes* a sais biliares é específica e não pode ser generalizada (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; OLIER et al. 2004). Olier et al. (2004) não encontraram correlação entre a tolerância a sais biliares e a origem dos isolados de *L. monocytogenes* em seus estudos. Neste trabalho, foram encontrados níveis reduzidos de adesão e invasão em presença de Oxgall 0,3% sem nenhuma

correlação com a origem da cepa. Além disso, vale ressaltar que a presença de Oxgall influenciou o tamanho do inóculo e, portanto, as menores taxas de invasão e adesão podem ser devidas ao menor número de células bacterianas presentes ou estresse celular.

Uma condição bastante comum, encontrada em alimentos e no processo *in vivo* de invasão por *L. monocytogenes* no hospedeiro é o pH ácido, sendo assim, a capacidade de *L. monocytogenes* multiplicar e sobreviver em um ambiente ácido é crucial para sua disseminação e virulência (GAHAN; HILL, 2005; OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009; WERBROUCK, et al., 2009).

Além disso, a tolerância a ácidos parece estar relacionada com a indução da expressão de genes de virulência em *L. monocytogenes*, sugerindo que em alimentos prontos para o consumo minimamente processados com pH ácido pode ocorrer aumento da virulência de *L. monocytogenes*. No hospedeiro, uma vez que o patógeno também encontra condições adversas de pH ácido (estômago) pode haver ainda uma vantagem adaptativa (CONTE et al., 2000; O'DRISCOLL et al., 1996; OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009; WERBROUCK et al., 2009).

Conte et al. (2000) demonstraram que uma linhagem selvagem de *L. monocytogenes* adaptada a pH ácido e um mutante ácido-tolerante apresentaram maior capacidade de invadir células Caco-2 do que a linhagem selvagem não adaptada. Aqueles resultados indicaram que a resposta à tolerância ácida por *L. monocytogenes*, antes do contato com o hospedeiro, poderia facilitar e promover o processo de invasão a células eucarióticas.

Estudo realizado por Garner et al. (2006) demonstrou que a invasividade de *L. monocytogenes* foi menor quando os isolados foram cultivados previamente em pH 5,5 corroborando com os resultados deste estudo quando houve incubação em pH 4,5. No trabalho de Galdiero, D'Isanto e Aliberti (1997) também foi observado que a presença de pH ácido desfavoreceu o processo de invasão a células Caco-2 por *L. monocytogenes*, tanto quando incubados a 30°C ou 20°C.

Outra condição que também pode influenciar a invasividade de *L. monocytogenes* é a temperatura de incubação devido à termoregulação dos genes de virulência (GARNER et al., 2006; KUSHWAHA; MURIANA, 2010). Garner et al. (2006) avaliaram a influência da temperatura na invasão de *L. monocytogenes* utilizando incubação prévia a 37°C e 7°C e constataram uma menor invasividade

quando os isolados de *L. monocytogenes* foram previamente cultivados a 7°C. Mesmo resultado foi obtido no presente trabalho quando houve incubação a 5°C.

Golowczyc et al. (2007) realizaram ensaio com *S. enteritidis* tratada previamente com proteína S obtidas de *Lactobacillus kefir* e observaram que estas proteínas se ligam a sítios específicos envolvidos com a invasão de células de culturas humanas na superfície da *Salmonella*, além disso, estas proteínas poderiam também competir pelos sítios na superfície dos enterócitos, e desta forma impedir a adesão de *Salmonella* a célula eucariótica. Aspectos semelhantes devem ser levados em consideração nos resultados encontrados neste trabalho ao avaliar a capacidade de adesão e invasão por isolados de *L. monocytogenes* quando incubados em presença de preparação contendo bacteriocinas de *E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A11 *L. sakei* 1, apesar de praticamente nenhuma alteração significativa ter sido observada.

Alguns estudos demonstraram efeitos antagônicos de probióticos e bactérias lácticas frente ao processo patogênico de *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Escherichia* spp (COLLADO et al., 2008; GAHAN; HILL, 2005; JANKOWSKA et al., 2008; MORONI et al., 2006).

Outros mecanismos podem estar relacionados com a capacidade dos probióticos e bactérias lácticas em evitar a adesão de patógenos nas células eucarióticas do que simplesmente a competição pelo mesmo receptor de adesão e por nutrientes. Acredita-se que certos metabólitos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas como por exemplo, ácido láctico, exopeptídeos, exopolissacarídeos, carboidratos e ácidos lipoteicóico possam causar um bloqueio estérico inespecífico nos receptores dos patógenos pelas bactérias lácticas influenciando este processo (CANDELA et al., 2008. JANKOWSKA et al., 2008; LAPARRA; SANZ, 2009; MATHYS; MEILE; LACROIX, 2009; SERVIN; COCONIER, 2003; XU et al., 2009).

Candela et al. (2008) observou grande redução na adesão de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (70 a 90%) e de *E. coli* ETEC (40 a 70%) quando incubados em co-cultura com *Bifidobacterium longum* Bar33, *Bifidobacterium lactis* Bar30, *Lactobacillus acidophilus* Bar13 and *Lactobacillus plantarum* Bar10. Jankowska et al. (2008) também observaram uma redução de 4 a 2 vezes na adesão de *S. enterica* subespécie *enteritidis* a células Caco-2 quando incubadas com *L. paracasei*. Naquele mesmo estudo, também foi observada o efeito da

incubação prévia de *L. paracasei* a células Caco-2 antes da adição de *S. enterica* e uma redução de 8 vezes foi observada.

Colado et al. (2008) estudaram linhagens probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidoacterium*, por meio de testes de agregação com patógenos e demonstraram que as propriedades probióticas eram altamente específicas e cepa-dependentes. Botes et al. (2008) observaram que as cepas probióticas *Enterococcus mundii* ST4SA e *L. plantarum* 423 não apresentaram capacidade de influenciar a adesão de *L. monocytogenes* Scott A em co-cultura. Os autores acreditam que este fato se deve à ligação destas cepas probióticas a receptores presentes nas células Caco-2 que não são reconhecidos por *L. monocytogenes*. No trabalho de Bambirra et al. (2007) foi observado o efeito da ingestão de *Lactobacillus sakei* 2a por camundongos infectados com *L. monocytogenes*. Os resultados daquele trabalho demonstraram que a população de *L. monocytogenes* presentes em fezes coletadas após infecção dos camundongos foi similar ao do grupo controle (sem ingestão do *L. sakei* 2a). Este resultado sugeriu que o efeito antagônico provocado pelo *L. sakei* frente a *L. monocytogenes* seria outro, diferente da competição pelos mesmos receptores de adesão.

No presente trabalho, também foram avaliados os potenciais dos co-cultivos de *E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A11 e *L. sakei* 1 em modular a adesão e invasão de isolados de *L. monocytogenes* em células Caco-2. Os resultados demonstraram que *E. faecium* 130 e *L. mesenteroides* A11 apresentaram maior efeito protetor sobre as células eucarióticas frente a infecção por *L. monocytogenes*. Recentemente, Nakamura et al. (2012) observaram o efeito antagônico de *Leuconostoc mesenteroides* e da suspensão das suas células mortas na infecção de célula Caco-2 e camundongos por *L. monocytogenes*. Tsai et al. (2004) também observaram o efeito protetor do co-cultivo com *E. faecium* TM39 e do sobrenadante da cultura desta mesma bactéria frente à adesão de *Helicobacter pylori* a cultura de célula secretora de muco HT29-MTX.

Lin et al. (2008) demonstraram que a presença do *Lactobacillus acidophilus* LAP5 foi mais eficaz em inibir a invasão de *Salmonella choleraesuis* em células Caco-2 se comparado com o sobrenadante livre de células de *Lactobacillus acidophilus* LAP5. Resultado semelhante foi observado no presente trabalho uma vez que a capacidade de adesão e invasão de isolados de *L. monocytogenes* foi

mais influenciada em co-cultura com as bactérias lácticas, em comparação com a presença das preparações contendo bacteriocinas.

Vários trabalhos demonstraram que outros fatores como presença de derivados de plantas, proteínas do leite e soja, proteases, tensão de oxigênio e presença de ácidos graxos podem alterar a capacidade de *L. monocytogenes* invadir e aderir células Caco-2 (ANDERSEN et al., 2007; KUDA et al., 2012; LONGHI et al., 2008; PETRONE et al., 1998; UPADHYAYA et al., 2012). Estes dados sugerem que estudos de outras condições encontradas no ambiente ou no alimento precisam ser aprofundados devido seu potencial de modular o processo de infecção por *L. monocytogenes*.

Meyer et al. (1992) não observaram correlação entre a porcentagem de invasão e de adesão com as origens dos isolados de *L. monocytogenes*. Outros trabalhos ainda demonstraram não haver correlação entre as populações de *L. monocytogenes* aderidas e internalizadas em células eucarióticas, sugerindo que este processo sofre influência na expressão de diferentes fatores de adesão e invasão como, por exemplo, as proteínas ligadoras de fibronectinas e internalinas (BUNDUKI; BELIVEAU; DONNELLY, 1993; KHUN; GOEBEL, 1989; MEYER et al., 1992, JARADAT; BHUNIA, 2003).

Khun e Goebel (1989) desenvolveram um mutante para a proteína p60 que está relacionada com a adesão de *L. monocytogenes* e demonstraram que o mutante apresentava maior redução na porcentagem da adesão do que na de invasão de células Caco-2 sugerindo que múltiplos fatores estão envolvidos com o processo de adesão e invasão. Jaradat e Bhunia (2003) analisaram a capacidade de invasão de 25 isolados de *L. monocytogenes* pertencentes a 13 sorotipos diferentes. Os autores observaram alta correlação entre os valores de adesão e invasão para linhagens dos sorotipos 3a, 3b, e 3c, para os quais maiores valores de adesão correspondiam a maiores taxas de invasão. Além disso, naquele estudo foi relatado que os para os outros sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) havia uma baixa correlação entre os valores de adesão e invasão.

No presente estudo, também não foi observada correlação entre as porcentagens de adesão e invasão por isolados de *L. monocytogenes* nas condições estudadas. Um exemplo evidente seria o isolado L.m. H-2 de origem alimentar que apresentou a maior taxa de invasão em todas as condições estudadas, entretanto não apresentou o mesmo perfil nos ensaios de adesão. Estes dados sugerem que, o

número de bactérias internalizadas independe do número de bactérias aderidas e que o processo de invasão também é influenciado pela modulação de genes e proteínas distintas daquelas envolvidas no processo de adesão.

Lizcano et al. (2010) demonstraram que os resultados obtidos com a adesão inicial de *Streptococcus pneumoniae* em placas de microtitulação para a avaliação da formação do biofilme não tinham correlação com a doença invasiva causada por este microrganismo. Entretanto, trabalho realizado por Sandal et al. (2007) demonstraram uma correlação positiva entre a arquitetura do biofilme formado pelo *Histophilus somni* e sua patogenicidade já que os isolados clínicos produziam mais biofilmes que os comensais. Recentemente, Safadi et al. (2012) analisaram a formação de biofilmes por *Escherichia coli* O104:H4 responsável por um surto na Alemanha com alta incidência de casos de síndrome hemolítico-urêmica (SHU) e mortes. Aquele trabalho indicou uma possível correlação entre a formação de biofilme e o alto potencial virulento da cepa *E. coli* estudada.

Os resultados deste trabalho com *L. monocytogenes* também sugerem uma potencial relação entre maior capacidade de formação de biofilme e invasão a células Caco-2. O isolado L. m. H-2 teve a maior capacidade de invasão de células Caco-2 em todas as condições avaliadas e o mesmo perfil foi observado para algumas condições no ensaio de formação de biofilmes em placas de microtitulação. Entretanto, ficou evidenciado que este tipo de correlação não ocorre em todas as condições, sendo cepa dependente.

Em estudo realizado por Riedel et al. (2009) foi desenvolvido um mutante de *L. monocytogenes* onde o gene para síntese de peptídeos de *quorum sensing* - *agrD* foi deletado. Os resultados demonstram que aquele mutante tinha menor capacidade de adesão em superfícies inertes e menor capacidade de invasão de células Caco-2, sugerindo que a formação de biofilmes e o processo de invasão a células por *L. monocytogenes* poderia estar relacionado com o gene *agrD*.

5.3. Expressão do gene *InlA* de *L. monocytogenes* em diferentes condições que mimetizam o trato gastrointestinal, alimentos e em preparações contendo bacteriocinas

Os alimentos como parte do ambiente de multiplicação de bactérias, podem conter diferentes níveis e tipos de nutrientes que podem interferir na expressão de genes de virulência (GARNER et al., 2006; JARADAT; BHUNIA, 2002). Jaradat;

Bhunia, (2002) demonstraram que a glicose, maior fonte de carbono para as bactérias, pode exercer um efeito repressor na expressão de alguns fatores de virulência. Garner et al. (2006) demonstraram que alto pH (7,4), presença de NaCl e ácidos orgânicos nas formulações de alguns alimentos podiam aumentar a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* (GARNER et al., 2006).

Bae et al. (2012) avaliaram a expressão global dos genes de *L. monocytogenes* quando incubados em caldo BHI adicionado de NaCl. Aqueles pesquisadores observaram que em caldo BHI suplementado com 1,2% de NaCl, a expressão de quatro genes foram induzidos, enquanto que houve redução na expressão de outros 24 genes. Aqueles resultados estão parcialmente em acordo com este trabalho uma vez que quatro dos isolados apresentaram a redução significativa da expressão do gene *inlA* no cultivo com cloreto de sódio, enquanto que para os outros isolados não houve diferença significativa.

Os resultados da expressão gênica de *L. monocytogenes* em pH ácido revelaram que esta condição modula a síntese de internalina A, pois houve diferença estatística para todos os isolados, comparados com o ensaio em caldo BHI. Os dados relatados por Werbrout et al. (2009) também demonstraram que o pH ácido pode influenciar a virulência de *L. monocytogenes* por meio da regulação gênica.

Duodu et al. (2010) demonstraram que *L. monocytogenes* alterou a expressão de seus genes quando incubada em matriz alimentícia à base de salmão. Naquele trabalho, também foi avaliada a influência de diferentes temperaturas de incubação na expressão do gene *inlA* (0, 4 e 20°C). Os resultados de Duodu et al. (2010) corroboraram com o presente trabalho, com o relato de uma redução na expressão de *inlA* por *L. monocytogenes* incubadas sob refrigeração.

Ratsiou et al. (2012) também avaliaram a influência de matriz alimentícia à base de carne e salsicha nos genes de virulência de *L. monocytogenes*, relatando que houve modulação dos genes *iap*, *gadC*, *gadE* e *InlA*.

Os resultados obtidos com as outras condições estudadas neste trabalho como a presença de bacteriocinas, sacarose e Oxgall demonstraram que a maioria dos isolados reduziram significativamente a expressão do gene *inlA*, com exceção do isolado L.m. HU 471, que apresentou uma expressão oito vezes maior na presença de sacarose, quando comparado com os resultados obtidos com a incubação em caldo BHI. Este relato sugere que dependendo do isolado de *L. monocytogenes* e do ambiente em que ele se encontra, ocorre a modulação da

expressão do gene *inlA* podendo ou não resultar na alteração da sua capacidade de invasão as células do hospedeiro. Outro relato observado neste trabalho foi a ausência de correlação entre os ensaios de invasão em células Caco-2 *in vitro* e a expressão do gene *inlA* e este fato pode ser explicado pela existência de muitos fatores e mecanismos de regulação envolvidos no processo de infecção por *L. monocytogenes*.

Os resultados deste trabalho demonstraram a importância do estudo do efeito de alimentos e do trato gastrointestinal na modulação do processo invasivo de *L. monocytogenes*. Este fato é bastante relevante para definir a segurança microbiológica de um alimento, uma vez que deve se considerar não somente a população de *L. monocytogenes* presente no alimento, mas também as condições a que este patógeno foi exposto previamente e o potencial impacto em sua patogenicidade.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode se concluir que:

- Houve variação na capacidade de formação de biofilme em placa de poliestireno entre diferentes isolados de *L. monocytogenes* cultivados em caldo BHI e caldo BHI contendo cloreto de sódio, sacarose e sais biliares.
- Foi desfavorecida a adesão e formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em pela técnica de cristal violeta em poliestireno utilizando pH ácido, sob refrigeração e na presença de preparações semi-purificadas contendo bacteriocinas de *Enterococcus faecium* 130, *Leuconostoc mesenteroides* A11 e *Lactobacillus sakei* 1.
- *L. monocytogenes* manteve a capacidade de aderir e invadir células Caco-2 mesmo após incubação em condições adversas (pH, solutos, bacteriocinas, temperatura).
- O isolado de *L. monocytogenes* L.m. H-2 (proveniente de alimento) apresentou a maior capacidade de invasão de células Caco-2 em todas as condições estudadas.
- Em co-cultivo com *L. monocytogenes*, *E. faecium* 130 apresentou maior capacidade que outras bactérias lácticas para modular as taxas de adesão e invasão de células Caco-2.
- A técnica de FISH foi eficaz para visualização da adesão de *L. monocytogenes* às células Caco-2, na presença de culturas de *L. sakei* 1, *E. faecium* 130 e *L. mesenteroides* A11.
- Estudos realizados com a técnica qRT-PCR para avaliação da expressão do gene *inlA* demonstraram que componentes comuns em alimentos, tais como cloreto de sódio e sacarose, podem alterar ou não a expressão do gene de virulência *inlA*, de maneira linhagem-dependente, com a possibilidade até de ocorrer maior expressão em condição de estresse (presença de sacarose, para L.m. HU471).
- A presença de bacteriocinas, pH ácido, e a incubação sob refrigeração regularam negativamente a expressão do gene *inlA* na maioria dos isolados e em alguns casos, ou não houve alteração da expressão.

Neste trabalho ficou evidenciada a complexidade de mecanismos regulatórios que envolvem a formação de biofilmes, capacidade de adesão/invasão de células eucarióticas por *L. monocytogenes* e a expressão do fator de virulência internalina A. Foi também evidenciado que há importantes variações linhagens-dependentes e, estudos neste sentido podem contribuir para a garantia da inocuidade de alimentos.

Referências

REFERÊNCIAS*

- ADZITEY, F.; HUDA, N. *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 2848-2855, 2010.
- ALVES, V.F.; De MARTINIS, E.C.P.; DESTRO, M.T.; VOGEL, B.F.; GRAM, L.; Antilisterial activity of a *Carnobacterium piscicola* isolated from brazilian smoked fish (*Surubim* [*Pseudoplatystoma* sp.]) and its activity against a persistent strain of *Listeria monocytogenes* isolated from Surubim. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 2068-2077, 2005.
- AMMOR, S.; TAUVERON, G.; DUFOUR, E.; CHEVALLIER, I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 2- Behaviour of pathogenic and spoilage bacteria in dual species biofilms including a bacteriocin-like-producing lactic acid bacteria. **Food Control**, v. 17, p. 462-468, 2006.
- ANDERSEN, J. B.; ROLDGAARD, B. B.; CHRISTENSEN, B. B.; LICHT, T. R. Oxygen restriction increases the infective potential of *Listeria monocytogenes* in vitro in Caco-2 cells and in vivo in guinea pigs. **BMC Microbiology**, v. 7, p. 1-7, 2007.
- BAE, D.; LIU, C.; ZHANG, T.; JONES, M.; PETERSON, S.N.; WANG, C. Global gene expression of *Listeria monocytogenes* to salt stress. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 906–912, 2012.
- BAMBIRRA, F. H. S.; LIMA, K. G. C.; FRANCO, B. D. G. M.; CARA, D. C.; NARDI, R. M. D.; BARBOSA, F.H.F.; NICOLI, J. R. Protective effect of *Lactobacillus sakei* 2a against experimental challenge with *Listeria monocytogenes* in gnotobiotic mice. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 663–667, 2007.
- BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. D. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p.1808 – 1815, 1983.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p.625-651, 2005.
- BELESSI, C.E.A; GOUNADAKI, A.S.; PSOMAS, A.N.; SKANDAMIS, P.N. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p.S46-S52, 2011.

* De acordo com: Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas / Grupo de Teses. Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso. Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord. et al. – São Paulo: SIBi/USP, 2004.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: Chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. **Food Control**, v. 29, p.82-90, 2013.

BLASCO, L.; FERRER, S.; PARDO, I. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 225, p. 115-123, 2003.

BOTES, M.; LOOS, B.; REENEN, C. A. V.; DICKS, L. M. T. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. **Archives of Microbiology**, v. 190, p. 573–584, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: < <http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.p hp? id=144&word=> >. Acesso em: 19 junho 2012.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2011. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_dta_perodo_2000_2011_site.pdf>. Acesso em: 18/09/2012.

BUENO, V.F.; BANERJEE, P.; BANADA, P.P.; DE MESQUITA, A.J.; LEMES-MARQUES, E.G.; BHUNIA, A.K. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 20, p. 43-59, 2010.

BUNDUKI, M. C.; BELIVEAU, C. M.; DONNELLY, C. W. Examination of attachment and phagocytic uptake of *Listeria* species by mammalian intestinal cells. **Food Microbiology**, v. 10, p. 507–516, 1993.

CALY, D.; TAKILT, D.; LEBRET, V.; TRESSE, O. Sodium chloride affects *Listeria monocytogenes* adhesion to polystyrene and stainless steel by regulating flagella expression. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 751–756, 2009.

CANDELA, M.; SEIBOLD, G.; VITALI, B.; LACHENMAIER, S.; EIKMANN, B. J.; BRIGIDI, P. Real-time PCR quantification of bacterial adhesion to Caco-2 cells: Competition between *Bifidobacterium* and enteropathogens. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 887–895, 2005.

CAREY, C. M.; KOSTRZYNSKA, M.; OJHA, S.; THOMPSON, S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, p. 125–132, 2008.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, p. 1-8, 2011.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC, 2012) Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/index.html>> acessado 06/09/2012>. Acesso em: 18/09/2012.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H. Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 103-111, 2000.

CHAE, M. S.; SCHRAFT, H.; HANSEN, L. T.; MACKERETH, R. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. **Food Microbiology**, v. 23, p. 250-259, 2006.

CHAN, Y. C.; WIEDMANN, M. Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 237 – 253, 2009.

CHANG, Y.; GU, W.; MCLANDSBOROUGH, L. Low concentration of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) affects biofilm formation of *Listeria monocytogenes* by inhibiting its initial adherence. **Food Microbiology**, v. 29, p. 10-17, 2012.

CHATURONGAKUL, S.; RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.16, p. 388-396, 2008.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p.11-19, 2006.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065-1073, 2008.

CONTE, M. P.; PETRONE, G.; DI BIASE, A. M.; AMMENDOLIA, M. G.; SUPERTI, F.; SEGANTI, L. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 29, p. 137-144, 2000.

- CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentação e Nutrição Araraquara**, v.19, p. 195-206, 2008.
- DELGADO, S.; O'SULLIVAN, E.; FITZGERALD, G.; MAYO, B. In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1119-1127, 2008.
- DESAI, M. A.; SONI, K. A.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, M. W.; SILVA, J. L.Reduction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and polystyrene surfaces by essential oils. **Journal of Food Protection**, v. 75, p.1332-1337, 2012.
- DESTRO, M. T.; LEITA, M. F. F.; FARBER, J. M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p. 705–711, 1996.
- DING, T.; IWAHORI, J.; KASUGA, F.; WANG, J.; FORGHANI, F.; PARK, M.; OH, D. Risk assessment for *Listeria monocytogenes* on lettuce from farm to table in Korea.**Food Control**, no prelo , 2012,
- DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, M.; MCLANDSBOROUGH, L. A. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2950-2958, 2002.
- DOMÉNECH, E.; BOTELLA, S.; FERRÚS, M. A.; ESCRICHE, I. The role of the consumer in the reduction of *Listeria monocytogenes* in lettuces by washing at home. **Food Control**, v.29, p.98-102, 2013.
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 15, p. 167–193, 2002.
- DROSINOS, E.H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, v. 74, p. 690–696, 2006.
- DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, p. 155-166, 2002.
- DUODU, S.; HOLST-JENSEN, A.; SKJERDAL, T.; CAPPELIER, J.M.; PILET, M.F.; LONCAREVIC, S. Influence of storage temperature on gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains grown in a salmon matrix. **Food Microbiology**, v. 27, p.795-801, 2010.

DUPRÈ, I.; ZANETTI, S.; SCHITO, A. M.; FADDA, G.; SECHI, L. A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 491–498, 2003.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 476-511, 1991.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2008. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

FORESTIER, C.; DE CHAMPS, C.; VATOUX, C.; JOLY, B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: *in vitro* adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 167–173, 2001.

FRODER, H.; MARTINS, C.G.; DE SOUZA, K. L. O.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M. T. Minimally processed vegetable salads: microbial quality evaluation. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 1277-1280, 2007.

FUCHIZAWA, I.; SHIMIZU, S.; KAWAI AND, S.; YAMAZAKI, K.; Specific detection and quantitative enumeration of *Listeria* spp. using fluorescent *in situ* hybridization in combination with filter cultivation (FISHFC). **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 502–509, 2008.

GAHAN, C.G.M.; HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1345-1353, 2005.

GALDIERO, E.; DISANTO, M.; ALIBERTI, F. Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*. **Research in Microbiology**, v.148, p. 305-313, 1997.

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

GARNER, M.R.; JAMES, K.E.; CALLAHAN, M.C.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. Exposure to salt and organic acids increases the ability of *L. monocytogenes* to invade Caco-2 cells but decreases its ability to survive gastric stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 5384-5395, 2006.

GASANOV, U.; HUGHES, D.; HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 851-875, 2005.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v. 19, p. 162-169, 2008.

GIANOTTI, A.; SERRAZANETTI, D.; KAMDEM, S.S.; GUERZONI, M.E. Involvement of cell fatty acid composition and lipid metabolism in adhesion mechanism of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 9-17, 2008.

GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 264-273, 2007.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C. T.; PALAZZO, I. C.V.; DARINI, A. L. C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of **Enterococcus** spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 668–675, 2008.

GOMES, B.C.; RODRIGUES, M.R.; WINKELSTRÖTER, L. K.; NOMIZO, A.; DE MARTINIS, E. C. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1083-1089, 2012.

GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p. 734–740, 2008.

GUERRIERI, E.; NIEDERHAUSERN, S.; MESSI, P.; SABIA, C.; ISEPPI, R.; ANACARSO, I.; BONDI, M. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, v. 20, p. 861-865, 2009.

HAIN, T.; CHATTERJEE, S.S.; GHAI, R.; KUENNE, T.; BILLION, A.; STEINWEG, C.; DOMANN, E.; KARST, U.; JANSCH, L.; WEHLAND, J.; EISENREICH, W.; BACHER, A.; JOSEFH, B.; SCHAR, J.; KREFT, J.; KLUMPP, J.; LOESSNER, M.J.; DORSCHT, J.; NEUHAUS, K.; FUNCHS, T.M.; SCHERER, S.; DOUMITH, M.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Pathogenomics of *Listeria* spp. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 297, p. 541-557, 2007.

JENSEN, A.; THOMSEN, L.E.; JØGENSEN, R.L.; LARSEN, M.H.; ROLDGAARD, B.B.; CHRISTENSEN, B.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L.; INGMER, H. Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 254-261, 2008.

HANDA-MIYA, S.; KIMURA, B.; TAKAHASHI, H.; SATO, M.; ISHIKAMA, T.; IGARASHI, K.; FUJII, T. Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 312 -318, 2007.

HARMSSEN, H. J. M.; ELFFERICH, P.; SCHUT, F.; WELLING, G. W. A 16S rRNA-targeted probe for detection of Lactobacilli and Enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 11, p. 3-12, 1999.

HARVEY, J.; KEENAN, K.P; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 24, p. 380-392, 2007.

HOFER, E.; DO NASCIMENTO, R. S.; DE OLIVEIRA, M. A. *Listeria monocytogenes* meningitis. Case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, p.173-177, 1998.

JADHAV, S.; SHAH, R.; BHAVE, M.; PALOMBO, E. A. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. **Food Control**, v. 29, p. 125-130, 2013.

JANKOWSKA, A.; LAUBITZ, D.; ANTUSHEVICH, H.; ZABIELSKI, R.; GRZESIUK, E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, doi: 10.1155/2008/357964, 2008.

JARADAT, Z.W.; BHUNIA, A.K. Glucose and nutrient concentrations affect the expression of 104-kilodalton Listeria adhesion protein in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4876-4883, 2002.

JARADAT, Z. W.; BHUNIA, A. K. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3640-3645, 2003.

JENSEN, A.; THOMSEN, L.E.; JØGENSEN, R.L.; LARSEN, M.H.; ROLDGAARD, B.B.; CHRISTENSEN, B.B.; VOGEL, B.F.; GRAM, L.; INGMER, H. Processing plant persistent strains of *Listeria monocytogenes* appear to have a lower virulence potential than clinical strains in selected virulence models. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 254-261, 2008.

JESSEN, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, p. 265-269, 2003.

KAWARAI, T.; FURUKAWA, S.; NARISAWA, N.; HAGIWARA, C.; OGIHARA, H.; YAMASAKI, M. Biofilm formation by *Escherichia coli* in hypertonic sucrose media. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, p. 630-635, 2009.

KUDA, T.; NAKAMURA, S.; NA, C.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. Effect of soy and milk protein-related compounds on *Listeria monocytogenes* infection in human enterocyte Caco-2 cells and A/J mice. **Food Chemistry**, v.134, p.1719-1723, 2012.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 55-61, 1989

KUSHWAHA, K.; MURIANA, P. M. Comparison of invasiveness among surface-adherent variants of *Listeria monocytogenes* in Caco-2 cell culture assays. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p.166-171, 2010.

KYLE, J. L.; PARKER, G. T.; GOUDEAU, D.; BRANDL, M. T. Transcriptome analysis of *Escherichia coli* O157:H7 exposed to lysates of lettuce leaves. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p.1375-1387, 2010.

LANDGRAF, I. M.; KOBATA, A. M. M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C. R. A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, p.63-67, 1999.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Comparison of *in vitro* models to study bacterial adhesión to the intestinal epithelium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, p. 695–701, 2009.

LAVERMICOCCA, P.; VALERIO, F.; LONIGRO, S.L.; DILEO, A.; VISCONTI, A. Antagonistic activity of potential probiotic *Lactobacilli* against the ureolytic pathogen *Yersinia enterocolitica*. **Current Microbiology**, v. 56, p. 175–181, 2008.

LEBEER, S.; VERHOEVEN¹, T, L, A; CLAES, I.J.J.; DE HERTOOGH, G.; VERMEIRE, S.; BUYSE, J.; VAN IMMERSEEL, F.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. FISH analysis of *Lactobacillus* biofilms in the gastrointestinal tract of different hosts. **Letters in Applied Microbiology**, p. 1-7, 2011.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology-SGM**, v. 149, p. 353–362, 2003.

- LIN, C. K.; TSAI, H. C.; LIN, P. P.; TSEN, H. Y.; TSAI, C. C. *Lactobacillus acidophilus* LAP5 able to inhibit the *Salmonella choleraesuis* invasion to the human Caco-2 epithelial cell. **Anaerobe**, v. 14, p. 251-255, 2008.
- LIU, D.; LAWRENCE, M. L.; AUSTIN, F. W.; AINSWORTH A. J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 133–140, 2007.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, p. 101-115, 2007.
- LIVAK, K, J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- LIZCANO, A.; CHIN, T.; SAUER, K.; TUOMANEN, E.I.; ORIHUELA, C.J. Early biofilm formation on microtiter plates is not correlated with the invasive disease potential of *Streptococcus pneumoniae*. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, p.124–130, 2010.
- LONGHI, C.; SCOARUGHI, G. L.; POGGIALI, F.; CELLINI, A.; CARPENTIERI, A.; SEGANTI, L. PUCCI, P.; AMORESANO, A.; COCCONCELLI, P. S.; ARTINI, M.; COSTERTON, J. W.; SELAN, L. Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 45-52, 2008.
- MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 287– 296, 2005.
- MARTINEZ, R. C. R.; DE MARTINIS, E. C. P. Antilisterial activity of a crude preparation of *Lactobacillus sakei* 1 bacteriocin and its lack of influence on *Listeria monocytogenes* haemolytic activity. **Food Control**, v. 16, p. 429-433, 2005.
- MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J.; GALIOTOU, M.; DROSINOS, E. H. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science**, v. 64, p.265–271, 2003.
- MATHYS, S.; MEILE, L.; LACROIX, C. Co-cultivation of a bacteriocin-producing mixed culture of *Bifidobacterium thermophilum* RBL67 and *Pediococcus acidilactici* UVA1 isolated from baby faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, p. 36–46, 2009.

MAUKONEM, J.; MÄTTÖ, J.; WIRTANEM, G; RAASKA, L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; SAARELA, M. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 327-356, 2003.

MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. 1972. Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J.R., & Ribbons, D.W. (Eds.), **Methods in Microbiology**, pp. 313-342. New York: Academic Press.

McGANN, P.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. The alternative sigma σ^B and the virulence gene regulator *PrfA* both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2919-2930, 2007.

McLAUHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p.15-33, 2004.

MERTINS, S.; JOSEPH, B.; GOETZ, M.; ECKE, R., SEIDEL, G., SPREHE, M.; HILLEN, W., GOEBEL, W., MÜLLER-ALTROCK, S. Interference of components of phosphoenolpyruvate system with the central virulence gene regulator *PrfA* of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Barcetriology**, v. 189, p. 473-490, 2007.

MEYER, D. H., BUNDUKI, M.; BELIVEAU, C. M.; DONNELLY, D. C. W. Differences in invasion and adherence of *Listeria monocytogenes* with mammalian gut cells. **Food Microbiol.** v. 9, p. 115–126, 1992.

MIETTINEN, M.K; BJÖRKROTH, K.J; KORKEALA, H.J.; Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, p. 187-92, 1999.

MINEI, C. C.; GOMES, B. C. ; RATTI, R. P. ; D'ANGELIS, C. E. M. ; DE MARTINIS, E. C. P. Influence of peroxyacetic acid, nisin and co-culture with *Enterococcus faecium* on *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 634-638, 2008.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biol**, v. 5, p. 2458-2461, 2007.

MØRETRØ, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of intercellular adhesion locus *ica* among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.5648-5655, 2003.

MORONI, O.; KHEADR, J.; BOUTIN, Y.; LACROIX, C.; FLISS, I. Inactivation of Adhesion and Invasion of Food-Borne *Listeria monocytogenes* by Bacteriocin-Producing *Bifidobacterium* Strains of Human Origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 6894–6901, 2006.

NAKAMURA, S.; KUDA, T. AN, C.; KANNO, T.; TAKAHASHI, H.; KIMURA, B. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. **Anaerobe**, v.18, p. 19-24, 2012.

NAVES, P.; Del PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ, V.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M.D.C.; SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial pathogenesis**, v.45, p. 86-91, 2008.

NEAL, J. A. Comparative analysis of training delivery methods for new employees cleaning and sanitizing retail deli slicers: An exploratory study. **Food Control**, v. 29, p. 149-155, 2013.

NICKLAS, J.; MOISAN, P.; STONE, M. R.; GOOKIN, J. L.; *In situ* molecular diagnosis and histopathological characterization of enteroadherent *Enterococcus hirae* infection in pre-weaning-age kittens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 2814–2820, 2010.

NILSSON, R.E.; ROSS, T.R.; BOWMAN, J.P. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, p.14-24, 2011.

O'DRISCOLL, B.; GAHAN, C. G.; HILL, C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1693–1698, 1996.

OLESEN, I.; VOGENSEN, F. K.; JESPERSEN, L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p. 669-680, 2009.

OLIER, M.; ROUSSEAU, S.; PIVETEAU, P.; LEMAITRE, J.P.; ROUSSET, A.; GUZZO, J. Screening of glutamate decarboxylase activity and bile salt resistance of human asymptomatic carriage, clinical, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 87–99, 2004.

- OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, E. G. A.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Quantification of *Listeria monocytogenes* in minimally processed leafy vegetables using a combined method based on enrichment and 16S rRNA real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 27, p. 19-23, 2010.
- PAN, Y.; BREIDT JR., F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 7711-7717, 2006.
- PEETERS, E.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p.157-165, 2008.
- PERRY, J. A.; CVITKOVITCH, D. G.; L ´EVESQUE, C. E. Cell death in *Streptococcus mutans* biofilms: a link between CSP and extracellular DNA. **FEMS Microbiological Letters**, v. 299, p. 261–266, 2009.
- PETERSEN, F.C.; TAO,L.; SCHEIE,A.A. DNA Binding-Uptake System: a Link between cell-to-cell communication and biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 4392–4400, 2005.
- PETRONE, G. ; CONTE, M. P.; LONGHI, C.; DI SANTO, S.; SUPERTI, F.; AMMENDOLIA, M. G.; VALENTI, P.; SEGANTI, L. Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 362-368, 1998.
- PORT, G.G.; FREITAG, N.E. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, *PrfA*, **Infection and Immunity**, v. 75, p. 5886-5897, 2007.
- PUMBWE, L.; SKILBECK, C.A.; NAKANO, V.; AVILA-CAMPOS, M.J.; PIAZZA R.M.; WEXLER, H.M. Bile salts enhance bacterial co-aggregation, bacterial-intestinal epithelial cell adhesion, biofilm formation and antimicrobial resistance of *Bacteroides fragilis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 43, p.78-87, 2007.
- RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria*--review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology and Immunology Infection**, v. 40, p.4-13, 2007.
- RANTSIOU, K.; GREPPI, A.; GAROSI, M.; ACQUADRO, A.; MATARAGAS, M.; COCOLIN, L. Strain dependent expression of stress response and virulence genes of *Listeria monocytogenes* in meat juices as determined by microarray. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p.116-122, 2012.

RATTI, R.P. **Listeria monocytogenes em alimentos fatiados e equipamentos: ocorrência, formação de biofilme e controle.** Ribeirão Preto, 2006. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

REISSBRODF, R. New chromogenic plating media detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp – an overview. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, p. 83-89, 2004.

RIEDEL, C. U.; MONK, I. R.; CASEY, P. G.; WAIDMANN, M. S.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 71, p. 1177–1189, 2009.

RIGANO, L.A.; SICILIANO, F.; ENRIQUE, R.; SEDÍN, L.; FILIPPONE, P.; TORRES, P.S.; QÜESTA, J.; DOW, J. M.; CASTAGNARO, A.P.; VOJNOV, A.A.; MARANO, M. R. Biofilm formation, epiphytic fitness, and canker development in *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*. **Molecular plant-Microbe Interactions**, v. 20, p. 1222 -1230, 2007.

ROCHE, S.M.; KEROUANTON, A.; MINET, J.; LE MONNIER, A.; BRISABOIS, A.; VELGE, P. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 151-155, 2009.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, v. 7, p. 194-203, 1996.

ROMBY, P.; VANDENESCH, F.; WAGNER, E.G.H. The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 229- 236, 2006.

SAFADI,R.; ABU-ALI, G. S.; SLOUP, R. E.; RUDRIK, J. T.; WATERS, C. M.; EATON, K. A.; MANNING, S. D. Correlation between *in vivo* biofilm formation and virulence gene expression in *Escherichia coli* O104:H4. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-7, 2012.

SAKATE, R. I.; ARAGON, L. C.; RAGHIANTE, F.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T.; Occurrence of *Listeria monocytogenes* in pre-sliced vacuum-packaged salami in Sao Paulo – Brazil. **Archivos Latinoamericanos De Nutricion**, v. 53, p. 184-187, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, W. D. **Molecular cloning. A laboratory manual.** 3º ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANDAL, I.; HONG, W.; SWORDS, W.E.; INZANA, T.J. Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni* . **Journal of Bacteriology**, v. 189, p. 8179-8185, 2007.

SANDASI, M.; LEONARD, C. M.; VILJOEN, A. M. The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms. **Food Control**, v. 19, p. 1070–1075, 2008.

SANT'ANA, A.; IGARASHI, M. C.; LANDGRAF, M.; M DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.155, p.1-9, 2012.

SAUDERS, B.D.; OVERDEVEST, J.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; WIEDMANN, M. Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4420-4433, 2012.

SCHAIK, W.V.; ABEE, T. The role of σ^B in the stress response of Gram-positive bacteria-targets for food preservation and safety. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 218-224, 2005.

SCHARFF RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. **Journal of Food Protection**, v. 75, p.123-31, 2012.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, p.111-114, 2003.

SCHWAB, U.; BOWEN, B.; NADON, C.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. The *Listeria monocytogenes* *prfAP2* promoter is regulated by sigma B in a growth phase dependent manner. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 329-336, 2005.

SCORTTI, M., MONZÓ, H.J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D.A.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. The PrfA virulence regulon. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1196-1207, 2007.

SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 741–754, 2003.

SEVEAU, S.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular mechanism exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. **Microbes and infection**, v. 9, p. 1167- 1175, 2007.

SHAKERI, S.; KERMANSHAHI, R. K.; MOGHADDAM, M. M.; EMTIAZI, G. Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. **Biofouling**, v. 23, p. 79 – 86, 2007.

SIMOES, M.; SIMOES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573–583, 2010.

SLEATOR, R.D.; CLIFFORD, T.; HILL, C. Gut osmolarity: a key environmental cue initiating the gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Medical Hypotheses**, v. 69, p. 1090-1092, 2007.

SLONIM, D.K.; YANAI, I. Getting started in gene expression microarray analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 5, p. 1-4, 2009.

STEINBERGER, R., E.; HOLDEN, P., A. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 5404–5410, 2005.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, 2000.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p.199-210, 2008.

SZEKÉR, K.; NÉMETH, E.; KUN, S.Z.; BECZNER, J.; GÁLFI, P. Adhesion of lactic acid bacteria to Caco-2 cells – evaluation of different detection methods. **Acta Alimentaria**, v. 36, p. 365–371, 2007.

TABOURET, M.; DE RYCKE, J.; AUDURIER, A.; POUTREL, B. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production, **Journal of Medical Microbiology**, v. 34, p. 13–18, 1991.

TAKAHASHI, H.; MIYA, S.; IGARASHI, K.; SUDA, T.; KURAMOTO, S.; KIMURA, B. Biofilm formation ability of *Listeria monocytogenes* isolates from raw ready-to-eat seafood. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1476–1480, 2009.

TÉMOIN, S.; ROCHE, S.M.; GRÉPINET, O.; FARDINI, Y. ; VELGE, P. Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains. **Microbiology- SGM**, v. 154, p. 939-948, 2008.

TETZ, G. V.; ARTEMENKO, N. K.; TETZ, V. V. Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1204–1209, 2009.

TIGANITAS, A.; ZEAKI, N.; GOUNADAKI, A. S.; DROSINOS, E. H.; SKANDAMIS, P. N. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a_w stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, p. 104-112, 2009.

TILNEY, L. G.; TILNEY, M. S. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. **Trends in Microbiology**, v.1, p. 25-31, 1993.

TINH, N.T.N.; DIERCKENS, K.; SORGELOOS, P.; BOSSIER, P. A Review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. **Marine Biotechnology**, v. 10, p. 1-12, 2008.

TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 22, p. 1438-1490, 2011.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Production of bacteriocin ST33LD, produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, as recorded in the presence of different medium components. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1585–1590, 2005.

TRESSE, O.; SHANNON, K.; PINON, A.; MALLE, P.; VIALETTE, M.; MIDELET-BOURDIN, G. Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces. **Journal of Food Protection**, v.70, p.1569-1578, 2007.

TRIAS, R.; BADOSA, E.; MONTESINOS, E.; BAÑERAS, L. Bioprotective *Leuconostoc* strains against *Listeria monocytogenes* in fresh fruits and vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, p. 91–98, 2008.

TSAI, C. C.; HUANG, L. F.; LIN, C. C.; TSEN, H. Y. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection in vitro by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. **International Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 1-12, 2004.

UPADHYAY, A.; JOHNY, A. K.; AMALARADJOU, M. R.; BASKARAN, S. A.; SIK KIM, K.; VENKITANARAYANAN, K. Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors **in vitro**, and down-regulate expression of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 88-94, 2012.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, p. 619-626, 2008.

VEEN, S.V.D.; ABEE, T. Importance of *SigB* for *Listeria monocytogenes* static and continuous- flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p.7854–7860, 2010.

VILAIN, S.; PRETORIUS, J. M.; THERON, J.; BROZEL, V., S. DNA as an Adhesin: *Bacillus cereus* requires extracellular DNA to form biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, p. 2861–2868, 2009.

WERBROUCK, H.; BOTTELDOOM, N.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; COILLIE, E. V. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 306-314, 2006.

WERBROUCK, H.; BOTTELDOORN, N.; CELEN, L.; DECOSTERE, A.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; COILLIE, E.V. Characterization of virulence properties of *Listeria monocytogenes* serotypes 4b strains of different origins. **Zoonoses Public Health** , v. 55, p. 242-248, 2008.

WHITCHURCH, C., B.; TOLKER-NIELSEN, T.; RAGAS, P.C.; MATTICK, J. S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. **Science**, v. 295, p. 1487, 2002.

WINKELSTRÖTER, L.K; GOMES, B.C; THOMAZ, M.R.S; SOUZA, V.M.; DE MARTINIS, E.C.P. 2011. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, p. 1404-1407, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Geneva, 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready -to- eat foods, 2004. Disponível em : <<http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf> . Acesso em 09/08/2012 .

WU, j.; XI, C. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 5390–5395, 2009.

XU, H.; JEONG, H. S.; LEE, H.Y.; AHN, H. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49 p. 434–442, 2009.

ZHAO, T.; DOYLE, M.P.; ZHAO, P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 70, p. 3996–4003, 2004.

ZOETENDAL, E.G.; RAJILIC-STOJANOVIC, M.; DE VOS, W.M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. **Gut**, v. 57, p.1605-1615, 2008.

Apêndices

APÊNDICES

Apêndice A

Resultados da contagem em placa de isolados de *L. monocytogenes* após cultivados em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h para comparação com a formação de biofilmes no ensaio de placa de microtitulação coradas com cristal violeta.

Tabela 1. Contagem das culturas de isolados de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) após cultivadas em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	9,2 ± 0,1	9,0 ± 0,1	9,2 ± 0,1	4,6±0,5	7,5 ± 1,4	8,1 ± 0,6	8,9± 0,2	8,8 ± 0,3	9,1 ± 0,1
L.m. HU 471	9,2± 0,1	9,0 ± 0,2	7,7±0,9	6,3 ±0,3	74 ± 0,2	8,4 ± 0,4	9,1 ± 0,1	9,3± 0,6	9,1 ± 0,2
L.m. HU 533	9,2± 0,1	8,9± 0,1	9,1 ± 0,1	7,4± 0,9	7,2± 0,1	8,2 ± 0,8	8,4 ± 0,8	9,1± 0,1	9,2 ± 0,1
L.m. Vi-1	9,4± 0,3	8,7±0,5	9,1± 0,3	4,2±0,1	7,8 ± 0,1	8,6 ±0,3	9,2± 0,1	9,5 ± 0,5	9,1 ± 0,1
L.m. H-2	9,0± 0,4	9,0± 0,2	8,9± 0,6	4,1±0,4	7,6± 0,3	8,7 ± 0,4	9,1± 0,2	9,2 ± 0,9	9,2± 0,1
L.m. FCF 11	9,0± 0,1	8,5 ±0,4	9,2± 0,3	3,9±0,9	7,4±0,3	8,5 ± 0,2	8,9± 0,3	8,9± 0,3	9,3 ± 0,2
L.m. INCQS 327	9,2 ± 0,2	8,8± 0,3	9,3±0,1	4,4±0,5	7,5 ± 0,2	8,0± 0,5	8,9±0,2	8,8± 0,5	9,3 ± 0,4
L.m. INCQS 353	8,8± 0,3	8,8± 0,4	9,0± 0,1	7,1± 0,1	6,9± 0,3	8,0± 0,3	8,5 ±0,0	8,3± 0,5	8,8± 0,4
L.m. Reg. 26c	9,1± 0,1	9,0 ± 0,1	9,1± 0,3	4,6±1,0	7,1± 0,2	8,4± 0,3	9,3±0,3	9,3±0,2	9,3±0,1
L.m. FCF 4	9,2± 0,1	9,0± 0,1	9,0 ± 0,5	4,7± 0,7	7,8± 0,3	8,3± 0,2	9,1± 0,1	8,7± 0,6	9,3± 0,1

Apêndice B

Resultados da contagem em placa de isolados de *L. monocytogenes* antes e após os ensaios de adesão e invasão a células Caco-2 quando incubados previamente em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Tabela 2. Contagem do inóculo de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) para o ensaio de adesão em células Caco-2 depois de cultivadas em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	7,2 ± 0,1	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,3	2,9±0,3	5,6 ± 0,2	6,4 ± 0,2	7,0 ± 0,1	7,1 ± 0,3	7,1 ± 0,1
L.m. HU 471	7,3 ± 0,2	6,9 ± 0,4	7,2±0,1	4,9 ±0,3	5,6 ± 0,2	5,0 ± 0,1	7,3 ± 0,1	7,3± 0,5	7,1 ± 0,3
L.m. HU 533	7,1± 0,3	6,8± 0,2	7,2 ± 0,1	4,0 ± 0,4	5,1± 0,1	6,8 ± 0,2	7,0 ± 0,3	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,2
L.m. Vi-1	6,8± 0,2	6,9±0,1	7,1± 0,1	2,3±0,2	5,2 ± 0,1	6,3 ±0,3	7,1± 0,3	7,1 ± 0,3	7,0 ± 0,2
L.m. H-2	7,1± 0,3	6,8± 0,3	6,9± 0,1	2,9±0,3	5,3± 0,4	6,4± 0,4	6,7± 0,1	7,1 ± 0,2	8,0± 0,9
L.m. FCF 11	7,1± 0,1	7 ±0,2	7,1± 0,1	2,3±0,3	5,1±0,2	6,4 ± 0,2	7,1± 0,1	7,1± 0,1	7,2 ± 0,3
L.m. INCQS 327	6,9 ± 0,2	6,7± 0,1	7,1±0,3	2,0±0,1	5,2 ± 0,3	6,1± 0,1	7,0 ±0,4	6,9± 0,2	7,1 ± 0,2
L.m. INCQS 353	6,7± 0,1	6,4± 0,2	7,0± 0,1	5,2± 0,2	4,6± 0,2	5,7± 0,3	6,4 ±0,2	6,2± 0,2	6,4± 0,3
L.m. Reg. 26c	7,0± 0,1	6,8 ± 0,4	7,3± 0,3	3,2±0,1	5,2± 0,2	5,2± 0,1	7,2±0,1	7,1±0,0	7,2±0,2
L.m. FCF 4	7,3± 0,2	7,0± 0,1	7,3 ± 0,4	3,6± 0,2	5,1± 0,4	7,0± 0,9	7,1± 0,2	7,2± 0,1	7,3± 0,1

Tabela 3. Contagem de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) após adesão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas previamente em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	4,8 ± 0,1	5,1 ± 0,1	4,8 ± 0,1	*	3,1 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,9 ± 0,1	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,3
L.m. HU 471	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,1 ± 0,1	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,2	3,7 ± 0,4	5,1 ± 0,1	4,9 ± 0,5	5,1 ± 0,3
L.m. HU 533	5,5 ± 0,6	4,9 ± 0,2	4,9 ± 0,2	2,8 ± 0,3	2,7 ± 0,5	3,9 ± 0,9	5,1 ± 0,3	5,2 ± 0,4	5,0 ± 0,2
L.m. Vi-1	5,1 ± 0,5	4,9 ± 0,12	5,0 ± 0,1	*	3,1 ± 0,2	3,9 ± 0,3	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,3	4,7 ± 0,2
L.m. H-2	5,2 ± 0,4	4,8 ± 0,3	5,0 ± 0,1	*	2,7 ± 0,4	3,9 ± 0,4	4,7 ± 0,2	4,8 ± 0,2	4,7 ± 0,1
L.m. FCF 11	5,2 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	*	2,8 ± 0,2	4,5 ± 0,5	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,1
L.m. INCQS 327	5,3 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,2	*	3,4 ± 0,5	3,5 ± 0,0	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,2	4,7 ± 0,2
L.m. INCQS 353	4,4 ± 0,1	4,2 ± 0,1	4,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2	3,2 ± 0,1	4,0 ± 0,2	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,3
L.m. Reg. 26c	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,3	5,9 ± 0,6	2,4 ± 0,1	3,0 ± 0,2	3,9 ± 0,5	4,9 ± 0,1	5,1 ± 0,0	5,1 ± 0,2
L.m. FCF 4	5,5 ± 0,2	4,9 ± 0,2	5,7 ± 0,5	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,8	4,2 ± 0,9	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,1	5,3 ± 0,1

*Contagens abaixo do limite de quantificação do método (30 UFC/placa)

Tabela 4. Contagem do inóculo de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) para o ensaio de invasão em células Caco-2 quando cultivadas em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	7,2 ± 0,1	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,3	2,9±0,2	5,6 ± 0,2	5,9 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,4 ± 0,4	7,0 ± 0,1
L.m. HU 471	7,2 ± 0,2	7,0 ± 0,1	7,3±0,2	4,9 ±0,1	5,1 ± 0,3	6,6 ± 0,2	7,1 ± 0,1	7,0± 0,5	7,3 ± 0,1
L.m. HU 533	7,1± 0,3	6,8± 0,2	7,1 ± 0,3	4,7 ± 0,4	5,2± 0,1	5,9 ± 0,4	7,3 ± 0,2	7,2 ± 0,3	7,2 ± 0,2
L.m. Vi-1	7,1± 0,2	7,0±0,3	7,3± 0,1	2,2±0,1	5,6 ± 0,1	6,9 ±0,3	7,2± 0,3	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1
L.m. H-2	7,1± 0,2	6,9± 0,3	7,0± 0,1	2,0±0,1	5,9± 0,3	7,3± 0,4	7,3± 0,1	7,6 ± 0,3	7,1± 0,3
L.m. FCF 11	7,2± 0,1	6,8 ±0,3	7,4± 0,4	2,3±0,1	5,3±0,3	6,8 ± 0,4	6,9± 0,1	6,9± 0,2	7,3 ± 0,3
L.m. INCQS 327	7,3 ± 0,2	6,7± 0,3	7,3±0,1	2,3±0,1	5,7 ± 0,3	5,6± 0,4	7,1 ±0,2	7,3± 0,2	6,9 ± 0,1
L.m. INCQS 353	6,8± 0,1	6,4± 0,2	7,0± 0,1	2,3± 0,2	4,9± 0,2	5,1± 0,2	6,5 ±0,2	5,8± 0,3	6,6± 0,3
L.m. Reg. 26c	7,1± 0,1	6,9 ± 0,4	7,7± 0,3	2,04±0,1	5,8± 0,2	6,8± 0,1	7,7±0,1	7,5±0,0	7,3±0,2
L.m. FCF 4	7,1± 0,2	6,9± 0,3	7,1 ± 0,2	3,9± 0,1	5,3± 0,4	6,3± 0,3	7,1± 0,1	7,6± 0,3	7,4± 0,4

Tabela 5. Contagem de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) após invasão em células Caco-2 por isolados de *L. monocytogenes* quando cultivadas previamente em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 37°C/24h e caldo BHI puro incubados a 5°C/72h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	3,6 ± 0,4	3,2 ± 0,3	3,5 ± 0,2	**	**	*	3,1 ± 0,1	2,9 ± 0,3	3,1 ± 0,1
L.m. HU 471	2,8 ± 0,3	3,1 ± 0,3	3,1 ± 0,1	**	*	*	2,7 ± 0,7	2,4 ± 0,4	3,7 ± 0,1
L.m. HU 533	2,8 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,1	*	*	**	3,0 ± 0,2	3,0 ± 0,4	2,6 ± 0,2
L.m. Vi-1	3,2 ± 0,3	3,4 ± 0,8	2,9 ± 0,5	**	**	*	3,1 ± 0,6	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,4
L.m. H-2	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1	*	*	*	4,1 ± 0,1	3,6 ± 0,4	4,1 ± 0,1
L.m. FCF 11	3,2 ± 0,1	3,4 ± 0,7	3,3 ± 0,3	*	*	*	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,1	3,4 ± 0,1
L.m. INCQS 327	3,1 ± 0,6	2,7 ± 0,2	2,8 ± 0,5	**	**	*	3,2 ± 0,1	2,7 ± 0,6	3,2 ± 0,2
L.m. INCQS 353	2,5 ± 0,5	3,4 ± 0,4	2,4 ± 0,5	**	*	*	2,5 ± 0,5	2,2 ± 0,3	2,2 ± 0,2
L.m. Reg. 26c	3,1 ± 0,1	3,8 ± 0,3	2,8 ± 0,6	**	*	*	2,8 ± 0,2	3,0 ± 0,0	2,9 ± 0,3
L.m. FCF 4	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,6	2,8 ± 0,2	**	*	*	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,1	3,1 ± 0,1

*Contagens abaixo do limite de quantificação do método (30 UFC/placa)

**Contagens abaixo do limite de detecção do método (10 UFC/placa)

Apêndice C

Resultados da contagem em placa de isolados de *L. monocytogenes* quando ressuspendidos (T_0) e após uma hora (T_1) de incubação em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 25°C/1h e caldo BHI puro incubados a 5°C/1h para avaliação da expressão do gene *inlA*.

Tabela 6. Contagem de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) para o ensaio de expressão gênica no tempo zero (T_0) quando os isolados foram ressuspensos em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1).

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	7,8 ± 0,1	7,8 ± 0,1	8,1 ± 0,3	7,8±0,2	7,9 ± 0,1	7,8, ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,0	7,8 ± 0,1
L.m. HU 471	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	8,0±0,2	7,7 ±0,1	7,7 ± 0,1	7,4 ± 0,1	7,6 ± 0,1	7,6± 0,0	7,5 ± 0,1
L.m. HU 533	7,6± 0,1	7,7± 0,2	8,0 ± 0,3	7,7± 0,0	7,9± 0,1	7,6 ± 0,1	7,6 ± 0,0	7,7± 0,2	7,7 ± 0,2
L.m. Vi-1	7,8± 0,2	7,9±0,1	8,0± 0,1	7,8±0,1	7,8 ± 0,0	7,8 ±0,1	7,9± 0,1	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1
L.m. H-2	7,8± 0,2	7,8± 0,1	7,8± 0,1	7,8±0,1	7,8± 0,2	7,7± 0,4	7,6± 0,1	7,7 ± 0,0	7,7± 0,1
L.m. FCF 11	7,8± 0,1	7,8 ±0,3	7,9± 0,4	7,8±0,1	7,8±0,3	7,8 ± 0,4	7,6± 0,1	7,6± 0,1	7,7 ± 0,1
L.m. INCQS 327	7,8 ± 0,1	7,8± 0,1	7,9±0,1	7,7±0,1	7,9 ± 0,3	7,8± 0,4	7,8 ±0,2	7,8± 0,2	7,8 ± 0,1
L.m. INCQS 353	7,6± 0,1	7,6± 0,2	7,8± 0,1	7,7± 0,2	7,7± 0,2	7,8± 0,2	7,6 ±0,2	7,6± 0,3	7,7± 0,1
L.m. Reg. 26c	7,7± 0,1	7,9 ± 0,1	8,1± 0,3	7,7±0,1	7,8± 0,2	7,7± 0,1	7,8±0,1	7,7±0,0	7,8±0,2
L.m. FCF 4	7,8± 0,2	7,9± 0,2	8,0 ± 0,2	7,8± 0,1	7,5± 0,4	7,8± 0,1	7,6± 0,1	7,7± 0,1	7,4± 0,1

Tabela 7. Contagem de *L. monocytogenes* (log UFC/mL) para o ensaio de expressão gênica após uma hora (T_1) de incubação em: caldo BHI puro, caldo BHI suplementado separadamente com NaCl 5%, sacarose 2%, Oxgall 0,3%, ácido clorídrico 4mol/L (pH4,5), BHI suplementado com extratos obtidos de bactérias produtoras de bacteriocinas (*E. faecium* 130, *L. mesenteroides* A 11 e *L. sakei* 1) incubados a 25°C/1h e caldo BHI puro incubados a 5°C/1h.

Isolados	Condições								
	BHI	BHI + NaCl 5%	BHI + Sacarose 2%	BHI + Oxgall 0,3%	BHI + pH 4,5	BHI 5°C/72h	BHI + sobrenadante de <i>E. faecium</i> 130	BHI + sobrenadante de <i>L. mesenteroides</i> A11	BHI + sobrenadante de <i>L. sakei</i> 1
L.m. ATCC 19115	7,7 ± 0,1	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,1	7,6±0,2	7,9 ± 0,1	7,8 ± 0,0	6,6 ± 0,8	7,8 ± 0,1	7,7 ± 0,1
L.m. HU 471	7,6± 0,1	7,7 ± 0,1	7,8±0,1	7,6 ±0,1	7,7 ± 0,1	7,7 ± 0,1	6,9 ± 0,9	7,7± 0,1	7,6 ± 0,2
L.m. HU 533	7,8± 0,1	7,8± 0,1	7,8 ± 0,1	7,6± 0,0	7,9± 0,1	7,7 ± 0,1	6,7 ± 0,7	7,8± 0,1	7,6 ± 0,1
L.m. Vi-1	7,8± 0,0	7,8±0,1	7,9± 0,2	7,5±0,1	7,9 ± 0,1	7,8 ±0,1	7,1± 0,6	7,8 ± 0,0	7,7 ± 0,1
L.m. H-2	7,8± 0,1	7,8± 0,1	7,9± 0,2	7,7±0,0	7,9± 0,1	7,8± 0,1	6,8± 0,7	7,7 ± 0,1	7,6± 0,1
L.m. FCF 11	7,8± 0,1	7,7 ±0,0	7,7± 0,1	7,7±0,1	7,8±0,1	7,7 ± 0,1	6,9± 0,7	7,7± 0,1	7,5 ± 0,1
L.m. INCQS 327	7,8 ± 0,1	7,8± 0,1	7,9±0,1	7,8±0,1	7,9 ± 0,1	7,6± 0,1	7,0 ±0,7	7,7± 0,1	7,6 ± 0,1
L.m. INCQS 353	7,7± 0,1	7,6± 0,2	7,8± 0,1	7,7± 0,1	7,6± 0,2	7,8± 0,2	6,9 ±0,7	7,6± 0,0	7,5± 0,1
L.m. Reg. 26c	7,7± 0,1	7,7 ± 0,1	7,9± 0,2	7,8±0,1	7,8± 0,0	7,7± 0,2	6,9±0,7	7,7±0,1	7,5±0,2
L.m. FCF 4	7,8± 0,1	7,8± 0,0	7,8 ± 0,1	7,8± 0,1	7,9± 0,1	7,7± 0,2	6,9± 0,1	7,7± 0,1	7,6± 0,1