UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LILIAN PEREIRA SILVA

**“Avaliação da expressão de genes de virulência por *Listeria monocytogenes* em alimentos
modelos”**

Pirassununga

2015

LILIAN PEREIRA SILVA

**“Avaliação da expressão de genes de virulência por *Listeria monocytogenes* em alimentos
modelos”**

“Versão corrigida”

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

S586a	<p>Silva, Lilian Pereira</p> <p>Avaliação da expressão de genes de virulência por <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos modelos / Lilian Pereira Silva. -- Pirassununga, 2015.</p> <p>86 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis.</p> <p>1. <i>Listeria monocytogenes</i> 2. Genes virulência 3. Expressão gênica 4. Alimento modelo. I. Título.</p>
-------	--

*A minha mãe Aparecida e ao meu pai Luis, por todo o amor incondicional,
carinho, suporte e dedicação por todo esse tempo.
Aos meus familiares e amigos pelo apoio.*

Agradecimentos

A Deus, por me iluminar, me guiar e me ajudar a ter discernimento diante dos caminhos da vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho e pela troca de experiência ensinamento por todos esses anos.

Aos meus pais, Aparecida e Luis, que sempre me deram suporte em todos os momentos da vida e me ajudaram a tornar meus sonhos realidade.

Aos meus familiares: Tios e primos que sempre me apoiaram.

Aos meus amigos Ana Lúcia, Cláudia, Paula, Mariellen, Diego, Richard e Jonathan pelo carinho e momentos de alegrias vividos e ao Francisco Junior pelo incentivo.

Ao Vinícius, por todo amor, carinho, e por me apoiar diante dos desafios.

Aos amigos do laboratório, Fernanda, Fabrício, Lizziane, Natália e a técnica Vanessa pelos bons momentos e todo o suporte.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga-USP, seus funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência da Engenharia de Alimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, por conceder o uso do laboratório para realização dos experimentos, aos professores pelas disciplinas cursadas e ao suporte dos funcionários da Pós-Graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento pessoal e a realização deste trabalho. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

RESUMO

SILVA, L. P. **Expressão de genes de virulência por *Listeria monocytogenes* em alimentos modelos**. 2015. 86f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O controle da contaminação de alimentos por *Listeria monocytogenes* é um desafio para a indústria, pois a bactéria é tolerante a muitas condições adversas que são empregadas para conservação de alimentos. *L. monocytogenes* é uma bactéria patogênica e pode causar doença de natureza não entérica grave, em pessoas imunocomprometidas, idosos e durante a gestação. No presente estudo foi avaliada a expressão gênica de duas linhagens *L. monocytogenes* IAL 633 sorotipo 1/2a mais comumente isoladas de alimentos e *L. monocytogenes* ATCC 19115 sorotipo 4b mais comumente encontradas em surtos hospitalares, utilizando caldos modelos formulados a partir de extratos de carne e peptona de peixe, suplementados ou não com glicose, cloreto de sódio, orégano, pimenta do reino e uma mistura desses ingredientes. Os caldos modelos formulados e suplementados ou não com os ingredientes foram incubados por 1 hora a 25°C e em seguida, foi realizada extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA). O cDNA foi amplificado e quantificado por PCR em tempo real, com *primers* para os genes alvos *prfA*, *inlA*, *actA* e *hly*, que codificam respectivamente o fator regulador positivo, internalina A, actina e hemolisina, relacionados à virulência desta bactéria.

L. monocytogenes IAL 633 sorotipo 1/2a cultivada em caldo de carne acrescido de glicose diminuiu a expressão de *prfA*, *actA* e *hly*, enquanto que em caldo de peixe acrescido do mesmo ingrediente, foi observada maior expressão para os genes *inlA*, *actA* e *hly*. Nos caldos de carne acrescidos de cloreto de sódio houve aumento da expressão de

hly em *L. monocytogenes* ATCC 19115 sorotipo 4b, mas o mesmo ingrediente causou redução da expressão dos genes *inlA*, *ActA* e *hly* em *L. monocytogenes* IAL 633. Em caldo de peixe adicionado de cloreto de sódio, houve concordância no efeito observado para as duas culturas de *L. monocytogenes* avaliadas, com menor expressão dos genes *inlA* e *prfA*.

Com pimenta do reino em caldo carne foi observado aumento da expressão de *actA* para *L. monocytogenes* ATCC 19115 e redução dos genes *prfA*, *inlA*, *actA* e *hly* para *L. monocytogenes* IAL 633. Já em caldo de peixe acrescido de pimenta do reino, a modulação gênica ocorreu somente para *L. monocytogenes* ATCC 19115, com redução do gene *prfA* e aumento *inlA* e *actA*.

O orégano foi o ingrediente que mais afetou a expressão gênica de *L. monocytogenes* nas condições estudadas, com aumento da expressão de *actA* em caldo de carne e redução de *hly*, para *L. monocytogenes* ATCC 19115. Em contrapartida, para *L. monocytogenes* IAL 633 ocorreu a repressão dos mesmos genes e também de *inlA* e *prfA*, enquanto que em caldo de peixe ocorreu redução somente para o gene *prfA*. Ainda, em caldo de peixe acrescido de orégano foi observado redução da expressão dos genes *prfA* e *inlA*, porém aumento na expressão de *actA* e *hly* para *L. monocytogenes* ATC 19115.

A combinação de todos os condimentos também afetou a expressão gênica, sendo que em caldo de carne houve aumento da expressão dos genes *prfA* e *inlA*, porém foi reduzida a expressão de *actA* para *L. monocytogenes* ATCC 19115. Para a mesma linhagem (ATCC 19115), em caldo de peixe ocorreu a redução da expressão dos genes *prfA*, *inlA* e *actA*. *L. monocytogenes* IAL 633 em caldo de carne com a mistura de ingredientes teve reduzida a expressão dos genes *inlA* e *actA*, essa redução também foi detectada em caldo de peixe para o gene *prfA*.

No presente estudo foi possível observar uma repressão de todos os genes alvos estudados para *L. monocytogenes* IAL 633 sorotipo 1/2a quando incubada em caldo de carne suplementado com os diferentes ingredientes, mas o mesmo padrão não foi observado para *L. monocytogenes* ATCC 19115 sorotipo 4b, indicando a complexidade da expressão gênica em função dos componentes de alimentos.

Palavras-chaves: *Listeria monocytogenes*, virulência, expressão gênica, alimentos modelos.

ABSTRACT

SILVA, L. P. **Expression of virulence genes by *Listeria monocytogenes* in model food systems.** 2015. 86p. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

The control of food contamination by *Listeria monocytogenes* is a challenge for the industry because the bacterium is tolerant to many adverse conditions applied in food preservation. *L. monocytogenes* can cause serious non-enteric disease in immunocompromised persons, in the elderly and during pregnancy. In the present study it was evaluated the gene expression of two strains, *L. monocytogenes* IAL 633 serotype 1/2a (most commonly isolated from food) and *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 serotype 4b (more common in clinical cases). Model broths were prepared with meat extract and fish peptone, supplemented or not with glucose, sodium chloride, oregano, black pepper and a mixture of these ingredients. The formulated model broths supplemented or not with the ingredients were incubated for 1 hour at 25° C and next, RNA extraction was performed and complementary DNA (cDNA) was synthesized. The cDNA was amplified and quantified by Real Time PCR with primers for the target genes: positive regulatory factor (*prfA*), internalin A (*inlA*), actin (*actA*) and hemolysin (*hly*).

L. monocytogenes IAL 633 serotype 1/2a grown in meat broth plus glucose decreased expression *prfA*, *actA* and *hly*, while in fish broth, increased expression was observed for *inlA*, *hly*, and *actA* genes. In meat broth added sodium chloride, increased *hly* expression was observed for *L. monocytogenes* ATCC 19115 serotype 4b but the same ingredient caused a decrease of the expression of genes *inlA* and *hly* in *L. monocytogenes* IAL 633. In fish broth added sodium chloride, for the two cultures of *L.*

monocytogenes evaluated there was a lower expression of *inlA* and *prfA* gene in comparison with the control.

With meat broth containing black pepper, it was observed an increased *actA* expression for *L. monocytogenes* ATCC 19115 and lower expression of *prfA*, *inlA*, *actA* gene; for *L. monocytogenes* IAL 633 lower expression of *hly* was observed in this broth formulation. In fish gravy plus black pepper, modulation of gene expression occurred only in *L. monocytogenes* ATCC 19115 that showed decrease for *prfA* and increase for *inlA* and *actA*.

Oregano was the ingredient that affected most the gene expression of *L. monocytogenes* under the conditions studied, with increased *actA* expression in broth and *hly* reduction for *L. monocytogenes* ATCC 19115. However, for *L. monocytogenes* IAL 633 there was repression of the *inlA* and *prfA* genes, in fish stock was reduced only for *prfA* gene. Also in fish stock plus oregano was observed reduction of *prfA* and *inlA* genes, but increased expression of the *actA* and *hly* for *L. monocytogenes* ATC 19115.

The combination of all the condiments also caused different effects on gene expression, and in broth increased the expression of genes *prfA* and *inlA*, but reduced the *actA* expression for *L. monocytogenes* ATCC 19115, for the same strain (ATCC 19115) broth fish was a reduction of *prfA*, *inlA* and *actA* genes. *L. monocytogenes* IAL 633 in broth with the mixture of ingredients reduced the expression of *inlA* and *actA* genes, this reduction were also seen in fish broth for the *prfA* gene.

L. monocytogenes has complexity of the modulation of the expression of virulence factors in food, but in the present study it was possible to observe a repression in the modulation pattern of all target genes studied *L. monocytogenes* IAL 633 serotype 1/2a

when incubated in broth supplemented with different ingredients, which did not occur for *L. monocytogenes* ATCC 19115 serotype 4b.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, virulence genes, gene expression, model food.

Lista de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i> (Fonte: CRUZ et al.,2008).....	28
Figura 2. Fluxograma representando a enumeração das bactérias em caldos alimentos modelos (tabela 2) antes e após a incubação por 1h a 25° C por meio da técnica de <i>drop plate</i> semeados em meio ágar BHI.....	36
Figura 3. Fluxograma representando a extração do RNA, a síntese do DNA complementar (cDNA) para posterior análise por PCR em tempo real.....	40
Figura 4. Reprodução de fotografia de gel de agarose (preparado conforme item 3.3.3) referente à análise quantitativa do RNA extraído das culturas de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115. Linhas: M - marcador de peso molecular; 1 e 2: caldos de carne (controle); 3: caldo de carne com glicose; 4: caldo de carne com NaCl; 5: caldo de carne com pimenta do reino; 6: caldo de carne com orégano; 7: caldo de carne com combinação de todos os ingredientes.....	46
Figura 5. (A) Curva de amplificação dos genes de virulência 16S rRNA, <i>bglA</i> , <i>inlA</i> , <i>prfA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> de <i>L. monocytogenes</i> IAL 633 (sorotipo 1/2a), linha tracejada indica o (threshold) limiar de detecção 0,014 (B) Dissociação (“melting”) dos amplicons dos genes de virulência de interesse: 16S rRNA (80°C), <i>bglA</i> (83,1°C), <i>inlA</i> (76,5°C), <i>prfA</i> (75,0°C), <i>actA</i> (77,7°C) e <i>hly</i> (77,4°C).....	50
Figura 6. Expressão relativa do gene <i>inlA</i> de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....	56

Figura 7. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....57

Figura 8. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....58

Figura 9. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....59

Figura 10. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....60

Figura 11. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....61

Figura 12. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* sorotipos IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....62

Figura 13. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....63

Figura 14. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....64

Figura 15. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....65

Figura 16. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....66

Figura 17. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....67

Figura 18. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....68

Figura 19. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....69

Figura 20. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....70

Figura 21. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* sorotipos IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.....71

Lista de Tabelas

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.....	33
Tabela 2. Formulações dos caldos de carne e de peixe modelos utilizados neste estudo.....	34
Tabela 3. Especificações dos <i>primers</i> que foram utilizados para avaliação da expressão gênica em <i>Listeria monocytogenes</i>	43
Tabela 4. <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115, temperatura de dissociação T _m (Melting) dos amplicons utilizados para amplificação dos genes alvos.....	48
Tabela 5. <i>L. monocytogenes</i> IAL 633, temperatura de dissociação T _m (Melting) dos amplicons utilizados para amplificação dos genes alvos.....	49
Tabela 6. Valores de Δ CT utilizados para análise da expressão dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>prfA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> em <i>L. monocytogenes</i> quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes.....	52
Tabela 7. Níveis de expressão (unidades arbitrárias) dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>prfA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> em <i>L. monocytogenes</i> quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes	53
Tabela 8. Porcentagem dos níveis de expressão (unidades arbitrárias) dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>prfA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> em <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes.....	54
Tabela 9. Porcentagem dos níveis de expressão (unidades arbitrárias) dos genes de virulência <i>inlA</i> , <i>prfA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> em <i>L. monocytogenes</i> IAL 633 quando cultivada em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e/ou combinação de todos os ingredientes.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Caldo Infusão Cérebro Coração

cDNA: DNA complementar

Ct: “*cycle threshold*”, ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorre a intersecção com o limiar de detecção

DEPC: Dietil pirocarbonato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

DTA: Doença Transmitida por Alimentos

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz

QR: Nível expressão gênica

Rev: Reverse primer

Fwd: Forward primer

NaCl: Cloreto de sódio

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

PBS: Solução salina Fosfatada Tamponada

RT-PCR: Transcrição reversa seguida da reação em cadeia polimerase em tempo real

RNA: Ácido ribonucléico

TBE: Solução tampão Tris/Borato/EDTA

T_m: temperatura de fusão (*melting temperature*) do amplicon

UFC: Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

H: hora

ml: mililitros

min.: minutos

nm: Nanômetro

µm: micrometros

mol/L: mol por litros

mM: milimolar

µg/mL: microgramas por mL

g: gravidade

µL: microlitro

ng/µL: nanograma por microlitro

SÚMARIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
2.2 Contaminações em alimentos por <i>L. monocytogenes</i>	25
2.3 Genes de virulência por <i>L. monocytogenes</i>	27
2.4 Análise quantitativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).....	30
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivos gerais.....	32
3.2 Objetivos específicos.....	32
4. MATERIAIS E METODOS.....	33
4.1 Culturas bacterianas.....	33
4.2 Preparo do alimento modelo.....	33
4.3 Avaliação da expressão dos genes de virulência de <i>L. monocytogenes</i>	35
4.3.1 Preparo dos inóculos bacterianos.....	35
4.3.2 Extração do RNA total.....	37
4.3.3 Análise da pureza e integridade do RNA extraído.....	37

4.3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA) para os genes de virulência <i>prfA</i> , <i>inlA</i> , <i>actA</i> e <i>hly</i> para detecção e quantificação por PCR em tempo real.....	41
4.4 Análises estatísticas.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1 Culturas bacterianas e enumeração das células de <i>Listeria monocytogenes</i>	45
5.2 Extração do material genético e integridade do RNA total usado para síntese de cDNA.. ..	45
5.3 Avaliação da expressão dos genes de virulência de <i>Listeria monocytogenes</i>	46
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÕES.....	76
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. Introdução

As toxinfecções alimentares despertam grande preocupação para a Saúde Pública, no Brasil e no mundo. Além disso, as doenças causadas por agentes transmitidos por alimentos tem grande impacto econômico, pois podem levar a recolhimento de alimentos do mercado e embargos, destruição de lotes de produtos e perda de produtividade, trazendo graves consequências para a economia e o desenvolvimento industrial (CUTIS et al., 2014; GOMES et al., 2013).

Os dados epidemiológicos referentes às Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são importantes para a definição de políticas de segurança alimentar. Nos Estados Unidos onde há dados bastante completos sobre a ocorrência de DTAs, estima-se que os principais patógenos alimentares tenham sido responsáveis por 9,4 milhões de casos de doenças, com 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes (SCALLAN et al., 2011).

No Brasil, estatísticas sobre as DTAs são mais escassas e segundo o Ministério da Saúde, de 1999 a 2004, ocorreram 3.410.048 internações devido a DTAs, gerando custos da ordem de 280 milhões de reais, relativos a despesas hospitalares e medicamentos. Outros dados apontaram que em 2012 foram registrados 792 surtos de doenças de origem alimentar no Brasil, sendo 78,7% dos registros provenientes das regiões sul e sudeste (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2005; VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, 2013).

Para diminuir o risco de ocorrência de DTAs, governos e instituições relacionadas à indústria de alimentos, passaram a recomendar a adoção da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle – APPCC como ferramenta para o conhecimento e gerenciamento dos perigos associados ao consumo de alimentos, visando à garantia da sua inocuidade (SANT'ANA; FRANCO, 2009).

Dentre os vários patógenos que podem causar doenças por via alimentar, destaca-se a bactéria *L. monocytogenes*, que causa uma doença rara, mas grave, de natureza predominantemente não entérica, responsável por muitas hospitalizações e mortes (SCALLAN et al., 2011).

O gênero *Listeria* era composto por 10 espécies, mas recentemente, Bakker et al. (2014) descreveram cinco novas espécies a partir de ambientes naturais e agrícolas dos Estados Unidos, somando atualmente um total de 15 espécies.

Apesar da diversidade de espécies, *L. monocytogenes* é a única reconhecidamente patogênica para o homem e compreende 13 sorotipos. Os sorotipos mais comuns em alimentos, indústrias e no ambiente são 1/2a e 1/2b, enquanto que o sorotipo 4b é o mais prevalente em casos clínicos (SWAMINATHAN; GEMER-SMIDT, 2007).

Apesar de procedimentos usuais de limpeza e sanitização, diferentes linhagens de *L. monocytogenes* podem ser isoladas de superfícies em ambientes industriais refrigerados, indicando o potencial de contaminação de alimentos por esta bactéria (CARPENTIER; CERF, 2011).

Neste sentido, o entendimento de mecanismos de sobrevivência de *L. monocytogenes* em ambientes adversos, bem como a elucidação da influência de fatores intrínsecos e extrínsecos de alimentos sobre a virulência deste patógeno, podem ajudar a garantir a inocuidade dos alimentos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é gram-positiva, em formato de bastonetes não esporulados, isolados ou aos pares. É frequentemente isolada de matérias em decomposição, solo e água, podendo sobreviver em ambientes desfavoráveis por longos períodos, em uma ampla faixa de temperatura (1 a 45°C) e de pH (4 a 9,6), em concentrações salinas de até 10% e na presença de alguns agentes antimicrobianos (BHUNIA, 2008) .

Está bem estabelecido que *L. monocytogenes* pode se multiplicar em alimentos e a bactéria já foi isolada de leite cru, queijos, carnes frescas e congelados, aves, frutos do mar, frutas e produtos hortícolas, bem como do ambiente e de equipamentos de indústrias processadoras de alimentos (MONTVILLE; MATTHEWS; KNIEL, 2012).

Há portadores humanos assintomáticos de *L. monocytogenes* e também há casos de infecção pela bactéria com sintomas brandos, como febre e gastroenterite, em pessoas imunocompetentes. Entretanto há grande preocupação com grupos de risco, que incluem gestantes, idosos, e pessoas com comprometimento imunológico, tais como pacientes em quimioterapia e transplantados, entre outros. Nestes casos, a listeriose pode ser invasiva e resultar em aborto, meningoencefalite, e até septicemia. A prevalência da listeriose é relativamente baixa, porém, apresenta taxa de letalidade de 20 a 30% (BHUNIA, 2008).

A ocorrência da listeriose depende do nível de contaminação dos produtos alimentícios por *L. monocytogenes*, da imunidade do hospedeiro e da virulência das cepas envolvidas. A dose infecciosa de *L. monocytogenes* não é conhecida, mas dados epidemiológicos indicam que é maior que 10^4 UFC/g. Dentre os alimentos mais comumente incriminados em surtos de listeriose destacam-se aqueles prontos para o consumo, mantidos sob-refrigeração e ingeridos sem aquecimento prévio, tais como leite

e produtos lácteos, carnes e derivados, peixes, vegetais e frutos do mar (KRAMARENKO et al., 2013).

2.2 Contaminações em alimentos por *L. monocytogenes*

Os alimentos contaminados são as maiores fontes de transmissão de *L. monocytogenes*, tanto em surtos como nos casos esporádicos de listeriose, indicando que o trato gastrointestinal (TGI) é o principal ponto de entrada do patógeno no organismo humano e o foco primário de colonização (JING et al., 2010).

L. monocytogenes é extremamente preocupante para as indústrias de processamento de carnes, muitos surtos de listeriose tem sido correlacionado ao consumo de produtos cárneos, onde muitas amostras de *L. monocytogenes* já foram isoladas (MARTIN et al., 2014). Essa preocupação também ocorre com varias indústrias alimentares, principalmente aos fabricantes de prontos para comer (RTE), peixes defumados salgados e embalados a vácuo são amplamente consumidos, e esse tipo de alimento também implica a contaminação por *L. monocytogenes* (JOHANSSON et al., 1999).

Fatores intrínsecos dos alimentos, bem como técnicas de conservação e armazenamento de uso comum no ramo alimentício podem modular fatores de virulência de bactérias patogênicas (RANTSIOU et al., 2011). Já foi demonstrado que pode ocorrer modulação de genes de virulência em *L. monocytogenes* sob diversas condições encontradas no ambiente, resultando num perfil variado de infectividade (OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009; BUENO et al., 2010).

Olesen et al. (2010) afirmam que *L. monocytogenes* tem a capacidade de crescer em sob o estresse salino e após uma hora nesta condição, pode ter induzida a transcrição

dos genes de virulência de *L. monocytogenes*, com maior capacidade de invasão de células eucarióticas (Caco-2).

A expressão de genes de virulência também pode ser modulada pela utilização de diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose ou frutose), conforme demonstrado por Datta e Kothary (1993) em seus estudos sobre produção de listeriolisina O.

Alves et al. (2003) avaliaram o crescimento de *L. monocytogenes* na presença de ingredientes que são encontrados comumente na culinária (orégano e pimenta do reino) e os resultados demonstraram que a adição deste ingredientes em caldo de cultura, mimetizando possíveis condições alimentares, representaram condições de estresse.

Segundo Garner et al. (2006), a invasividade de uma mesma cepa de *L. monocytogenes* pode diferir em até 1.000 vezes, em função da variação de condições ambientais. As condições comumente encontradas em alimentos como a presença de NaCl, pH ácido e baixas temperaturas de armazenamento podem ter efeito modulatório sobre os genes de virulência de *L. monocytogenes* (CONTE et al., 2000; GARNER et al., 2006; OLESEN; VOGENSEN; JESPERSEN, 2009; WERBROUCK et al., 2009).

Duodu et al. (2010) relataram que houve alteração da expressão de genes de virulência em *L. monocytogenes* quando cultivada em uma matriz alimentícia à base de salmão, contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio e pH.

2.3 Genes de virulência de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes tem a capacidade de infectar uma variedade de tipos celulares e, por ser um patógeno intracelular, pode infectar células fagocíticas e não fagocíticas (células epiteliais, endoteliais, hepáticas e fibroblastos). *L. monocytogenes* pode disseminar-se para gânglios linfáticos mesentéricos, e replicar-se no baço e fígado, sendo capaz de causar bacteremia, infecções cerebrais e perinatais (SILVA et al., 2012).

L. monocytogenes adere-se a células intestinais do hospedeiro e é internalizada por fagocitose ou endocitose, utilizando E-caderina como receptor para sua entrada na célula. É capaz de escapar do vacúolo fagocítico, pela formação de poros por meio de listeriolisina-O, fosfatidil-inositol e fosfolipase C. Livre no citosol, a bactéria multiplica-se, infecta células adjacentes e pode entrar na corrente sanguínea (COSSART; TOLEDO-ARANA, 2008).

A maioria dos genes que codifica os fatores de virulência de *L. monocytogenes* está localizada no cromossomo, em um *cluster* de genes de virulência ativados pela proteína ativadora transcrricional *prfA*, ou fator regulador positivo (MARQUES; YANO, 2004; MERTINS et al., 2007).

Os genes de virulência melhores descritos de *L. monocytogenes* são internalina A (*inlA*), internalina B (*inlB*), hemolisina (*hly*) e actina (*actA*), que estão envolvidos respectivamente nas etapas de invasão, infecção e disseminação do patógeno na célula hospedeira, conforme ilustrado na figura 1 (JARADAT; BHUNIA, 2002; LIU et al., 2007; TÉMOIN et al., 2008).

Figura 1. Ilustração do ciclo de vida intracelular de *Listeria monocytogenes* (Fonte: CRUZ et al., 2008).

O gene *prfA* mantém inativos genes de virulência de *L. monocytogenes* fora da célula hospedeira. Entretanto, durante a infecção, é ativada a transcrição dos genes da ilha de patogenicidade conhecida como LIPI-1 (ilha de patogenicidade de *Listeria* 1), culminando com a síntese das proteínas internalinas A e B (HERAS et al., 2011; CRUZ, et al., 2008). As proteínas internalinas possuem um domínio N-terminal com muitas repetições de leucinas, que se ligam especificamente com o receptor E-caderina (E-cad) do hospedeiro. A E-cad é uma proteína transmembranar presente na junção de células epiteliais e, a interação entre *inlA*, *inlB* e E-cad permite a fixação e invasão bacteriana da célula do hospedeiro. O *prfA* também é o regulador do gene que codifica a listeriosina-O (*hly*) responsável pela formação de poros na parede do fagossomo, que conduz ao escape da bactéria do vacúolo para o citoplasma (BIERN et al., 2007). Na fase seguinte à invasão das células epiteliais por *L. monocytogenes*, polímeros de actina são condensados em um dos polos da bactéria, formando uma pseudo-cauda de actina (também conhecida como cauda de cometa). Essa estrutura proporciona movimento da bactéria dentro do

citoplasma da célula hospedeira e possibilita a disseminação célula-a-célula, iniciando um novo ciclo de infecção. Para esta etapa, a expressão do gene *actA* é crucial para a invasão de novas células (TRAVIER et al., 2013).

Fatores intrínsecos e extrínsecos de alimentos podem ser combinados como barreiras para a multiplicação bacteriana, mas *L. monocytogenes* tem a capacidade acentuada de modular a expressão de genes de virulência em resposta a condições de estresse (LIGOWSKA et al., 2011; RANTSIOU et al., 2011; GARNER et al., 2006; JARADAT; BHUNIA, 2002; ROMBY; VANDENESCH; WAGNER, 2006).

Jaradat e Bhunia (2002) avaliaram a influência do meio de cultivo e de condições ambientais na expressão de proteínas de adesão e invasão em *L. monocytogenes*, utilizando técnicas baseadas em imunologia. Aqueles autores concluíram que meios ricos em nutrientes e com altas concentrações de glicose suprimiram a expressão de *Listeria* adhesion Protein (LAP), provavelmente por meio de mudanças de pH e acúmulo de subprodutos de processos fermentativos.

O gene sigma B codifica um fator regulador chave em *L. monocytogenes* e contribui para a sobrevivência da bactéria em condições de estresse. Garner et al. (2006) estudaram características de virulência de *L. monocytogenes* 10403S e de seu mutante deletado para o gene sigma B, quando submetidos a estresse. Os resultados permitiram aos autores concluir que características associadas à virulência de *L. monocytogenes* determinantes para a definição da dose infecciosa, provavelmente eram afetadas por fatores relacionados a alimentos, tais como concentração de sal, pH e presença de ácidos orgânicos.

Olesen et al. (2009) avaliaram a expressão gênica e o potencial de virulência de *L. monocytogenes*, por meio de estudos de invasão de células eucarióticas, após exposição da bactéria a pH ácido (5,5) e estresse osmótico (NaCl 4,5%). Concluíram que alguns

genes de virulência poderiam ter um aumento de expressão, bem como a capacidade de *L. monocytogenes* aderir e invadir células eucarióticas poderia ser maior pós-estresse.

2.4 Análise quantitativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

A extração de RNA de culturas bacterianas, seguida da síntese de DNA complementar e análise quantitativa pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) é muito utilizada para estudos da modulação da expressão de genes de virulência bacterianos. Para isso, o RNA é extraído de uma cultura e em seguida, por meio da enzima transcriptase reversa é sintetizado DNA complementar (cDNA) (Werbrouck et al., 2007). O cDNA pode ser amplificado por PCR em tempo real, utilizando *primers* (sequências iniciadoras) específicos para cada gene de virulência de interesse. Para detecção do produto amplificado é necessária a escolha de um marcador fluorescente e, dentre estes, o SYBR Green® é o mais utilizado, devido ao seu baixo custo e eficácia, intercalando-se na dupla fita de DNA sintetizado, o que causa emissão de fluorescência verde (GAO; ZHANG; MELDRUM, 2011).

A técnica de RT-PCR é vantajosa por ser mais rápida e sensível quando comparada com métodos convencionais de quantificação de RNA, como o *Northen blot*, que permite o estudo do perfil de expressão de RNA mensageiro, por meio de eletroforese em gel, seguida de hibridação com sonda radioativa ou fluorescente (CAREY et al., 2008; DUODU et al. 2010; LIGOWSKA et al., 2011; WERBROUCK et al., 2007).

Novas técnicas como microarranjos de cDNA e RNA-seq também vem sendo utilizadas para análise da expressão de genes de virulência em bactérias (CROUCHER; THOMSON, 2010).

O estudo da modulação gênica de *L. monocytogenes* em diferentes condições encontradas em alimentos é um vasto campo de investigação e diante do exposto, desperta interesse o conhecimento da influência de diferentes matrizes alimentícias na expressão genica de *L. monocytogenes*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão gênica de *L. monocytogenes* em alimentos modelos (caldo de carne e caldo de peixe) adicionados de ingredientes comumente utilizados em alimentos.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a expressão de genes localizados na ilha de patogenicidade de *L. monocytogenes* em condições ideais de cultivo e na presença de cloreto de sódio, glicose, orégano e/ou pimenta do reino, utilizando a técnica de PCR em tempo real.
- Comparar os níveis de expressão dos genes estudados e avaliar o possível efeito dos diferentes ingredientes no potencial virulento de *L. monocytogenes*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Culturas bacterianas

As linhagens bacterianas (tabela 1) utilizadas nos experimentos eram pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. As culturas foram mantidas a -80°C em caldo infusão cérebro-coração (Oxoid, Reino Unido) suplementado com 20% de glicerina (Synth, Brasil), e reativadas em caldo infusão cérebro-coração (Oxoid) BHI por 24 horas a 37°C.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste estudo.

Microrganismo	Origem	Meio de cultura	
Temperatura	de incubação		
<i>Listeria monocytogenes</i> (sorotipo 1/2a)	IAL 633 ⁽¹⁾	BHI	37 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> (sorotipo 4b)	ATCC 19115 ⁽¹⁾	BHI	37°C

⁽¹⁾ Adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

4.2 Preparo dos alimentos modelos

Como modelos alimentares foram utilizados caldos preparados conforme Alves et al. (2003). O caldo de carne foi formulado com 1,8% de proteose peptona (Oxoid), 1,2% de extrato de carne (Oxoid), 0,6% de extrato de levedura (Oxoid) e 2% de amido de milho (Synth). O caldo de peixe era composto por 3,4% de peptona de peixe (HiMedia, Índia), 4% de cloreto de sódio (Synth, Brasil) e 0,5% de extrato de levedura (Oxoid).

Cada caldo foi adicionado de outros ingredientes, conforme descrito na tabela 2 e, em seguida, foram esterilizados em autoclave por 15min/121°C. Os ingredientes acrescentados foram cloreto de sódio (Synth), D-glicose (Synth), orégano (*Origanum vulgare*) desidratado (Casa Massaro, Ribeirão Preto, Brasil), pimenta do reino (*Piper nigrum*) moído (Casa Massaro, Ribeirão Preto, Brasil).

Tabela 2. Formulações dos caldos de carne e de peixe modelos utilizados neste estudo.

Formulações	D-glicose (0,5%)	NaCl (4%)	Pimenta do Reino (0,2%)	Orégano (0,2%)
1	Controle*			
2	✓			
3		✓		
4			✓	
5				✓
6	✓	✓	✓	✓

Conforme Alves et al. (2003) com modificações.

* Caldo de carne ou caldo de peixe sem adição de ingredientes adicionais.

✓ Indica a adição do ingrediente.

Os meios preparados foram mantidos em geladeira a 4°C e utilizados para realização dos experimentos no prazo máximo de duas semanas.

4.3 Avaliação da expressão dos genes de virulência de *L. monocytogenes*

4.3.1 Preparo dos inóculos bacterianos

Cada uma das linhagens deste estudo (*L. monocytogenes* IAL 633 e *L. monocytogenes* ATCC 19115) foi inoculada separadamente (200µl da cultura estoque) em 8 mL de caldo BHI (Oxoid) e incubadas por 24 horas a 37°C. Em seguida o volume total de cada caldo foi centrifugado a 10.000g por 8 minutos (Sorvall Legend Mach 1.6R, Reino Unido), o sobrenadante foi descartado e as células de *L. monocytogenes* foram ressuspensas em 1000 µl dos caldos modelos de carne ou de peixe, adicionados ou não de outros ingredientes, conforme previamente descrito item 3.2. Foram realizadas triplicatas experimentais para todos os tratamentos.

Uma alíquota de 100 µl das células ressuspensas de cada caldo modelo foi utilizada para enumeração de *L. monocytogenes*, por meio de diluição decimal seriada preparada em solução salina fosfatada pH 7,0 (PBS), que era constituída por cloreto de sódio 0,8% (Synth), cloreto de potássio 0,020% (Merck, Brasil), fosfato de sódio dibásico 0,115 (Vetec, Brasil) e fosfato de potássio monobásico 0,020% (Synth). A semeadura foi realizada em superfície (10µl) pela técnica de *drop plate* (conforme Figura 2), com incubação por 24h a 37°C (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001).

Os volumes restantes de cada suspensão de *L. monocytogenes* nos caldos modelos (900µl) foram incubados por 1 hora a 25°C (REIS et al., 2011; OLESEN et al., 2011). Decorrido esse período, uma alíquota de 100µL foi utilizada para preparar diluições decimais seriadas e a população de *L. monocytogenes* foi novamente enumerada por semeadura em superfície em placas de ágar BHI (Oxoid), expressando os resultados em UFC/ml.

Figura 2. Fluxograma representando a enumeração das bactérias em caldos alimentos modelos (tabela 2) antes e após a incubação por 1h a 25°C por meio da técnica de *drop plate* semeados em meio ágar BHI.

4.3.2 Extração do RNA total

As alíquotas remanescentes (800µl) dos caldos modelos foram centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e as células de *L. monocytogenes* foram submetidas a extração de RNA total. Para isso, foram adicionadas de 1mL de TRIzol® *(Zymo Research, EUA) e mantidas por 5 min a temperatura ambiente (TA), para ocorrer lise celular. Após este tempo, foram adicionados 200µL de clorofórmio em cada uma das amostras que foram agitadas manualmente por inversão. Após 3 minutos a temperatura ambiente, cada uma das amostras foi centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4°C.

Foram separadas três fases, sendo um sedimento branco (DNA), uma fase incolor (RNA) e uma rósea (proteínas), conforme descrito pelo fabricante do reagente de extração. A fase incolor foi transferida para um microtubo (1,5 mL), foram adicionados 500µL de isopropanol e mantido por 10 minutos a temperatura ambiente, para precipitação de RNA. Foi feita nova centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com 500 µL de etanol absoluto (Synth) diluído a 75% (v/v), seguido de centrifugação por mais 5 minutos a 10.500g. Após todo o processo, o extrato contendo RNA foi adicionado de solução aquosa a 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato - DEPC (Sigma-Aldrich, EUA) e mantido por 10 minutos a 60°C para facilitar sua dissolução, seguindo recomendação do fabricante dos reagentes de extração. Cada extrato foi dividido em três alíquotas, que foram armazenadas a -80°C.

4.3.3 Análise da pureza e integridade do RNA extraído

O grau de pureza de cada amostra de RNA total extraído das células de *L. monocytogenes* foi avaliado em espectrofotômetro (NanoDrop®, Thermo Scientific, EUA) pela leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Valores de razão entre as leituras em 260 e 280 nm acima de 1,8 indicariam pureza adequada das amostras para utilização nos experimentos de quantificação da expressão gênica. Razões inferiores poderiam indicar a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou próximo a 280nm. Pela leitura no espectrofotômetro NanoDrop® a 260 nm também foi possível quantificar o RNA presente nas amostras (ng/μl) e os extratos foram posteriormente diluídos com água DEPC (Sigma-Aldrich) para obter soluções contendo 40ng/μl (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Em seguida, o extrato contendo o RNA foi tratado, conforme instruções do fabricante, com o kit *DNAse I RNase-free* (Thermo Scientific, Lituânia) para remoção de DNA contaminante.

Amostras dos extratos contendo RNA também foram analisadas por eletroforese para verificação de sua integridade. Para isso, foi preparado gel de agarose (Axygen, EUA) 1,2% (p/v) em tampão Tris/Borato/EDTA – TBE (Invitrogen) preparado com água DEPC (Sigma-Aldrich). Como marcador de peso molecular na eletroforese (100 a 5000 pb) foi utilizado 1 μl do *GeneRuler Express DNA Ladder* #SM1551 (Thermo Scientific, EUA). Uma alíquota de 2μL de cada extrato contendo RNA foi misturada com 3μl de água ultrapurificada (MilliQ®, Millipore, EUA) e 5μl de solução 0,07% (p/v) de azul de bromofenol (Bio-Agency, Brasil). O volume total da solução assim preparada (10 μl) foi aplicado no gel de agarose. A eletroforese desenvolveu-se com tampão TBE por 40 min, numa corrente elétrica 1,81A a 90V (PowerPac™, BioRad, EUA).

O gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídeo (Synth) a 0,5 µl/mL e observado em transiluminador ultravioleta para fotodocumentação (MiniBis UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

A amostra seria considerada íntegra se estivessem presentes no gel de agarose duas bandas com pesos moleculares de aproximadamente 1000pb e 1500pb, correspondentes respectivamente às frações 16S e 28S do RNA ribossomal bacteriano.

Na figura 3 está apresentado o fluxograma seguido para esta parte do estudo.

Figura 3. Fluxograma representando a extração do RNA, a síntese do DNA complementar (cDNA) para posterior análise por PCR em tempo real.

4.3.4 Síntese de DNA complementar (cDNA) para os genes de virulência *prfA*, *inlA*, *actA* e *hly* para detecção e quantificação por PCR em tempo real

As amostras de RNA foram diluídas para obter uma concentração de 100ng/μL e em seguida foi realizada a reação para a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir do RNA extraído de *L. monocytogenes* cultivada em diferentes condições (Tabela 2). Para isso, foram seguidas as instruções do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* contendo inibidor de RNase (n° 4374966, Applied Biosystems, EUA). As amostras de cDNA foram mantidas a -20°C até a realização do ensaio de PCR em tempo real.

O cDNA foi analisado por monoplex PCR em tempo real, para a quantificação da expressão dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*. Como controles endógenos foram utilizados os genes *housekeeping* 16S rRNA e β-glicosidase (*bglA*), conforme Tabela 3 (TASARA; STEPHAN, 2007).

O volume final de cada reação de PCR em tempo real foi de 12,5μL, sendo 2μL de extrato de cDNA, 6,25μL do reagente ABsolute™ QPCR SYBR® Green mix (Thermo Scientific, EUA), 3μL de água purificada (Milli-Q, Millipore, EUA) e 0,63μL de cada solução de *primer* (*forward* e *reverse*) a 5μM (Invitrogen, EUA). O protocolo de amplificação consistiu de uma etapa inicial de 15 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por dois segundos, anelamento a 55°C por 10 segundos e extensão a 72°C por 10 segundos (TASARA; STEPHAN, 2007). Os ensaios foram realizados considerando um limiar de detecção (“threshold”) de 0,014, sendo que os valores de Ct (“cycle threshold”) correspondiam ao ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorria a intersecção com este limiar (GRADY et al., 2008).

Os valores de Ct foram utilizados para avaliar a expressão diferencial dos genesalvos nas diferentes condições e, para isso, foi calculado o $\Delta\Delta CT$. Conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001), a expressão gênica foi calculada com a fórmula $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial e ΔCT representa a diferença entre o CT do gene alvo de interesse amplificado e o CT do gene controle endógeno amplificado. O $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra teste e o ΔCT da amostra de referência - calibrador (controle sem tratamento, caldo de carne e ou peixe, tabela 2).

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

$$\begin{aligned} & \text{- Normalização: } Ct_{(\text{gene alvo})} - Ct_{(\text{controle endógeno})} = \Delta Ct \\ & \text{- Calibração: } \Delta Ct_{(\text{condição estresse})} - \Delta Ct_{(\text{caldo modelo sem suplemento})} = \Delta\Delta Ct \end{aligned}$$

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

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

Os valores da expressão gênica de cada isolado obtido nas diferentes condições foram representados em unidades arbitrárias.

Tabela 3. Especificações dos *primers* que foram utilizados para avaliação da expressão gênica em *Listeria monocytogenes*.

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'- 3')</i>	<i>Amplicons</i>	<i>Referências</i>
<i>16S-rRNA-fwd</i>	GATGCATAGCCGACCTGAGA	35pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>16S-rRNA-ver</i>	TGCTCCGTCAGACTTTCGTC	35pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>bglA-fwd</i>	GCCTACTTTTTATGGGGTGGAG	417pb	Tasara e Stephan (2007)
<i>bglA-ver</i>	CGATTAAATACGGTGCGGACATA	417pb	Tasara e Stephan (2007)
<i>inlA-fwd</i>	GAACCAGCTAAGCCIGTAAAAG	82pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>inlA-ver</i>	CGCCIGTTTGGGCATCA	82pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>lprfA-fwd</i>	CAATGGGATCCACAAGAATATTGTAT	86pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>prfA-ver</i>	GATGGTCCCGTTCTCICTAA	86pb	Werbrouch et al. (2009)
<i>actA-fwd</i>	CGGGTAAATGGGTACGTGAT	85pb	Duodu et al. (2010)
<i>actA-ver</i>	TGGTCAATTAACCCTGCACTT	85pb	Duodu et al. (2010)
<i>hly-fwd</i>	TGCAAGTCCTAAGACGCCA	113pb	Duodu et al. (2010)
<i>hly-ver</i>	CACTGCATCTCCGTGGTATACTAA	113pb	Duodu et al. (2010)

4.4 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com valores obtidos das triplicatas biológicas de cada ensaio, sendo estes comparados com o caldo modelo controle. Os dados foram submetidos ao teste One-Way (ANOVA) seguido por Dunnett com significância ($P < 0.05$). A análise estatística e a confecção dos gráficos foram efetuadas por meio do software Graph Pad Prisma 5, EUA.

5. Resultados

5.1 Culturas bacterianas e enumeração de *Listeria monocytogenes*

Os resultados referentes à enumeração de *L. monocytogenes* em todos os caldos preparados conforme tabela 2, imediatamente após inoculação (T0) e após incubação por 1 hora a 25°C (T1), revelaram uma população de 10^9 UFC/mL em todos os caldos modelos avaliados. Esse dado é importante porque indica que possíveis modificações nas quantidades de RNA detectadas em cada condição seriam consequência de alterações da expressão gênica, e não poderiam ser atribuídas a variações quantitativas das populações bacterianas.

5.2 Pureza e integridade do RNA obtido das culturas nas diferentes condições

As razões entre as leituras em comprimentos de onda de 260nm e 280nm dos extratos de RNA total obtidos, em todas as condições, variaram de 1,6 a 2,2, indicando boa pureza. A integridade do RNA extraído foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose e foram observadas bandas correspondentes às frações 16S rRNA e 28S rRNA (Figura 4).

Figura 4. Reprodução de fotografia de gel de agarose (preparado conforme item 3.3.3) referente à análise quantitativa do RNA extraído das culturas de *L. monocytogenes* ATCC 19115. **Linhas:** **M** - marcador de peso molecular; **1 e 2:** caldos de carne (controle); **3:** caldo de carne com glicose; **4:** caldo de carne com NaCl; **5:** caldo de carne com pimenta do reino; **6:** caldo de carne com orégano; **7:** caldo de carne com combinação de todos os ingredientes.

5.3 Avaliação da expressão dos genes de virulência de *Listeria monocytogenes*

Utilizando os extratos de RNA obtidos a partir dos isolados de *L. monocytogenes* IAL 633 e *L. monocytogenes* ATCC 19115 cultivados em caldo de carne ou peixe, nas diferentes condições (descritas na tabela 2), os níveis de expressão dos genes *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* foram avaliados por meio de síntese de cDNA e análise quantitativa relativa dos amplicons por PCR em tempo real.

As respectivas temperaturas de dissociação dos amplicons obtidos (*16S rRNA*, *bglA*, *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*) foram comparadas às temperaturas de fusão (T_m) obtidas da literatura, indicando a correta amplificação dos genes de interesse no presente trabalho (TASARA e STEPHAN, 2007).

As temperaturas de dissociação de todos os genes de *L. monocytogenes* IAL 633 e *L. monocytogenes* ATCC 19115, cultivadas em caldo de carne e peixe, analisados no presente estudo, variaram entre 75,2° C a 83,7°C e 73,2°C a 82,8° respectivamente, conforme descrito nas tabelas 4 e 5.

abela 4. *L. monocytogenes* ATCC 19115, temperatura de dissociação T_m (Melting) dos amplicons utilizados para amplificação dos genes alvos.

Isolados	Genes	Caldo de Carne	Caldo Carne + D- Glicose	Caldo Carne + NaCl	Caldo Carne + Pimenta do Reino	Caldo Carne + Orégano	Caldo Carne + Combinado
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>16s rRNA</i>	80,3°C±0,52	80,4°C±0,87	81,6°C±1,31	81,1°C±1,32	81,3°C±1,20	80,3°C±0,5
	<i>bglA</i>	82,7°C±1,68	81,6°C±0,89	81,4°C±0,92	82,7°C±1,12	82,6°C±0,92	82,6°C±1,02
	<i>inlA</i>	76,4°C±0,59	76,2°C±0,65	76,5°C±0,77	75,4°C±0,96	75,1°C±1,2	76,4°C±0,58
	<i>prfA</i>	74,1°C±0,47	74,3°C±0,84	74,1°C±0,23	73,2°C±0,74	74,4°C±0,77	74,1°C±1,16
	<i>actA</i>	77,2°C±0,14	77,6°C±0,75	77,4°C±0,47	77,4°C±0,32	77,3°C±0,64	77,4°C±0,86
	<i>hly</i>	77,4°C±1,23	77,3°C±0,94	78,2°C±1,26	77,9°C±0,55	77,7°C±0,41	77,6°C±0,78
		Caldo Peixe	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe +
	<i>16s rRNA</i>	80,4°C±0,89	81°C±0,53	81,3°C±0,64	81,3°C±0,23	81,3°C±0,52	81°C±0,72
	<i>bglA</i>	82,6°C±0,77	81,9°C±0,98	82,8°C±1,2	79,2°C±0,53	80,2°C±0,98	80,3°C±1,1
	<i>inlA</i>	76,5°C±0,23	76,5°C±0,63	76,5°C±0,89	76,5°C±0,77	76,5°C±0,45	76,5°C±0,48
	<i>prfA</i>	74,3°C±0,64	74,1°C±0,14	74,1°C±0,31	73,2°C±1,45	74,4°C±0,72	74,1°C±0,77
	<i>actA</i>	77,1°C±0,53	77,4°C±0,89	77,4°C±0,11	77,4°C±0,88	77,7°C±0,41	77,4°C±0,89
	<i>hly</i>	77,4°C±0,52	76,3°C±0,69	77,8°C±0,64	77,6°C±0,44	76,4°C±0,23	78,5°C±1,67

Tabela 5. *L. monocytogenes* IAL 633, temperatura de dissociação T_m (Melting) dos amplicons utilizados para amplificação dos genes alvos.

Isolados	Genes	Caldo de Carne	Caldo Carne + D- Glicose	Caldo Carne + NaCl	Caldo Carne + Pimenta do Reino	Caldo Carne + Orégano	Caldo Carne + Combinado
<i>L. monocytogenes</i> IAL 633	<i>16s rRNA</i>	80,1°C±0,59	79,6°C±1,12	79,4°C±1,3	79,5°C±0,93	80,1°C±56	80,7°C±1,53
	<i>bglA</i>	82,1°C±0,71	81,9°C±1,45	82,5°C±1,11	82,4°C±0,14	82,2°C±4,5	83,4°C±2,63
	<i>inlA</i>	75,4°C±0,24	76,1°C±1,28	75,8°C±0,89	75,8°C±0,63	76,2°C±0,96	75,9°C±1,3
	<i>prfA</i>	74,7°C±0,26	75,1°C±0,45	75,6°C±2,6	74,7°C±0,11	75,9°C±0,86	75,6°C±0,18
	<i>actA</i>	76,8°C±0,47	76,5°C±1,54	76,8°C±0,54	76,5°C±0,45	76,5°C±1,54	76,5°C±0,46
	<i>hly</i>	77,3°C±0,88	77,4°C±1,7	77,4°C±2,32	77,1°C±1,48	77,1°C±0,41	77,1°C±0,77
		Caldo Peixe	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe + Combinado
	<i>16s rRNA</i>	80,1°C±0,18	80,1°C±0,14	82,5°C±0,96	80,1°C±0,26	79,8°C±2,3	80,1°C±2,1
	<i>bglA</i>	82,5°C±0,89	83,7°C±0,71	83,4°C1,53	82,5°C±0,88	82,2°C±0,14	82,2°C±0,63
	<i>inlA</i>	79,2°C±2,6	76,5°C±0,14	76,8°C±0,25	74,4°C±1,56	76,8°C±0,26	79,5°C±0,96
	<i>prfA</i>	75,2°C±0,96	75,9°C±0,63	75,6°C±0,78	75,9°C±0,89	74,7°C±0,36	75,2°C±0,71
	<i>actA</i>	77,4°C±0,26	77,1°C±0,18	74,1°C±0,88	75,9°C±1,82	75,9°C±1,62	77,1°C±0,96
	<i>hly</i>	77,1°C±0,14	77,7°C±0,88	77,7°C±2,6	76,5°C±1,53	76,5°C±0,18	77,4°C±0,89

A figura 5A ilustra a curva de amplificação do cDNA de *L. monocytogenes* IAL 633. A Na figura 5B estão representadas as curvas de fusão do amplicons *16S rRNA*, *bglA*, *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*. Gráficos semelhantes foram obtidos para todas as outras condições e os valores de Ct e Tm foram utilizados para a análise quali e quantitativa da expressão gênica.

(A)

(B)

Figura 5. (A) Curva de amplificação dos genes *housekeeping* 16S rRNA, *bglA*, e dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* de *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a) cultivadas em caldo de carne. Linha tracejada indica o limiar de detecção (threshold) de 0,014 (B) Curva (“melting”) dos amplicons dos genes de virulência de interesse: 16S rRNA (80°C), *bglA* (83,1°C), *inlA* (76,5°C), *prfA* (75,0°C), *actA* (77,7°C) e *hly* (77,4°C).

Os valores de Ct obtidos na análise por PCR em tempo real foram convertidos em ΔCt (tabelas 6 e 7) e em seguida transformados para valores reais da expressão gênica, em unidades arbitrárias (tabelas 8 e 9). Os dados foram submetidos ao teste One-Way (ANOVA), seguido por Dunnett e os resultados são mostrados a seguir.

Tabela 6. Valores de ΔCT utilizados para análise da expressão dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* em *L. monocytogenes* ATCC 19115 quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes.

Isolados	Genes	Caldo de	Caldo	Caldo Carne	Caldo Carne	Caldo Carne	Caldo Carne
		Carne	Carne + D- Glicose	+ NaCl	+ Pimenta do Reino	+ Orégano	+ Combinado
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>inlA</i>	12,62±0,12 ^a	13,34±0,67	20±0,01	17,19±0,22	19,52±0,01	67,7±0,09 ^a
	<i>prfA</i>	13,01±1,04 ^a	11,17±0,58	11,61±2,65	10,99±4,06	13,77±0,59	14,29±1,61 ^a
	<i>actA</i>	13,69±1,02 ^{ab}	11,79±1,74	10,87±3,09	16,59±4,29 ^a	15,01±3,22 ^a	12,11±3 ^b
	<i>hly</i>	7,30±0,83 ^{ab}	7,97±0,63	8,22±2,10 ^a	7,53±0,85	7,19±1,08 ^b	11,36±1,2
		Caldo Peixe	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe + Combinado
	<i>inlA</i>	22,92±1,17 ^{ab}	11,01±40	16,64±77 ^b	25,45±0,69 ^a	20,49±4,25 ^b	19,43±1,23 ^b
	<i>prfA</i>	66,43±0,96 ^b	60,71±8,82	17,67±0,00 ^b	7,96±0,36 ^b	15,68±0 ^b	16,48±0 ^b
	<i>actA</i>	12,10±0,99 ^{ab}	12,22±0,92	12,58±0,72	13,42±3,21 ^a	14,47±1,55 ^a	10,77±0,08 ^b
	<i>hly</i>	11,62±0,84 ^a	12,01±0,76	11,35±1,21	9,96±3,82	15,48±1,9 ^a	10,69±1,9

^a Indica resultado em que o ΔCT foi significativamente maior ($P < 0.05$) em relação a condição controle.

^b Indica resultado em que o ΔCT foi significativamente menor ($P < 0.05$) em relação a condição controle.

Tabela 7. Valores de ΔCT utilizados para análise da expressão dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* em *L. monocytogenes* IAL 633 quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes.

	Genes	Caldo de	Caldo	Caldo Carne	Caldo Carne	Caldo Carne	Caldo Carne
		Carne	Carne + D- Glicose	+ NaCl	+ Pimenta do Reino	+ Orégano	+ Combinado
<i>L. monocytogenes</i> IAL 633	<i>inlA</i>	12,09±2,08 ^b	13,47±1,26	10,56±0,26 ^b	11,59±1,61 ^b	10,05±0,49 ^b	10,53±2,96 ^b
	<i>prfA</i>	10,80±0,94 ^b	8,99±0 ^b	6,94±0,01	8,05±0 ^b	6,28±0 ^b	11,96±0,04
	<i>actA</i>	17,0±0,93 ^b	6,741±0,03 ^b	4,55±0,14 ^b	8,29±0,01 ^b	8,03±0,01 ^b	11,46±1,02 ^b
	<i>Hly</i>	10,43±0,99 ^b	8,20±3,2 ^b	7,06±2,2 ^b	5,01±0,08 ^b	6,24±1,2 ^b	10,51±0,94
		Caldo Peixe	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe + Combinado
	<i>inlA</i>	11,91±1,29 ^a	12,49±0,71 ^a	11,12±0,12	11,31±1,52	11,38±0,13	10,59±0,28
	<i>prfA</i>	12,20±0,98 ^b	12,23±40,1	7,35±2,8 ^b	11,31±1,53	10,57±3,09 ^b	5,29±1,1 ^b
	<i>actA</i>	13,64±1,06 ^a	19,2±3,6 ^a	9,75±1,4	11,31±1,54	12,41±2,34	8,29±4,8
	<i>Hly</i>	10,72±0,98 ^a	14,6±2,2 ^a	6,26±2,8	11,31±1,55	7,84±3,38	7,46±2,59

^a Indica resultado em que o ΔCT foi significativamente maior ($P < 0.05$) em relação à condição controle.

^b Indica resultado em que o ΔCT foi significativamente menor ($P < 0.05$) em relação à condição controle.

Tabela 8. Porcentagem dos níveis de expressão (unidades arbitrárias) dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* em *L. monocytogenes* ATCC 19115 quando cultivados em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e combinação de todos os ingredientes.

Isolados	Genes	Caldo Carne ^a	Caldo Carne + D-Glicose	Caldo Carne + NaCl	Caldo Carne + Pimenta do Reino	Caldo Carne + Orégano	Caldo Carne + Combinado
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>inlA</i>	1	0,64	1,26	1,42	0,49	3,6
	<i>prfA</i>	1	3,58	2,65	4,11	0,59	7,42
	<i>actA</i>	1	3,89	7,26	4,29	4,73	3,23
	<i>hly</i>	1	0,63	2,1	0,85	0,2	1,08
		Caldo Peixe ^a	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe + Combinado
	<i>inlA</i>	1	0,71	0,12	1,78	0,13	0,28
	<i>prfA</i>	1	0,82	0,01	0,36	0,01	0
	<i>actA</i>	1	0,92	0,72	3,21	1,67	0,16
	<i>hly</i>	1	0,76	1,21	3,82	70,41	2,13

Tabela 9. Porcentagem dos níveis de expressão (unidades arbitrárias) dos genes de virulência *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* em *L. monocytogenes* IAL 633 quando cultivada em caldo de carne e peixe suplementados com D-glicose 0,5%, NaCl 4%, orégano 0,2%, pimenta do reino 0,2% e/ou combinação de todos os ingredientes.

	Genes	Caldo Carne	Caldo Carne + D-Glicose	Caldo Carne + NaCl	Caldo Carne + Pimenta do Reino	Caldo Carne + Orégano	Caldo Carne + Combinado
<i>L. monocytogenes</i> IAL 633	<i>inlA</i>	1	0,67	0,01	0,22	0,021	0,09
	<i>prfA</i>	1	0	0,01	0,01	0	0,04
	<i>actA</i>	1	0,03	0,14	0,01	0	0,1
	<i>Hly</i>	1	0,01	0,02	0,08	0,94	0,54
		Caldo Peixe ^a	Caldo Peixe + D-Glicose	Caldo Peixe + NaCl	Caldo Peixe + Pimenta do Reino	Caldo Peixe + Orégano	Caldo Peixe + Combinado
	<i>inlA</i>	1	3841	77,27	1,01	5,36	11,23
	<i>prfA</i>	1	4004,2	32,08	5,46	3,9	119,74
	<i>actA</i>	1	3206,6	14,82	3,76	2,34	40,82
	<i>Hly</i>	1	2282,7	23,01	0,09	7,49	9,59

Para *L. monocytogenes* ATCC 19115 cultivada em caldo de carne adicionado de todos os condimentos, houve aumento do nível de expressão ($P < 0.05$) do gene *inlA* quando comparado ao caldo de carne controle conforme figura 6.

Figura 6. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes ATCC 19115 cultivada em caldo de peixe apresentou aumento da expressão do gene *inlA*, no caldo acrescido de pimenta do reino em relação ao controle ($P<0.05$). Nos caldos de peixe acrescidos de NaCl, orégano e/ou combinações houve redução ($P<0.01$) na expressão de *inlA* (Figura 7).

Figura 7. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes IAL 633 cultivada em caldo de carne, apresentou redução significativa ($P<0.001$) na expressão do gene *inlA*, em relação ao caldo controle, em comparação com os caldos acrescidos de NaCl, pimenta do reino, orégano e/ou combinações de ingredientes (Figura 8)

Figura 8. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Nas culturas de *L. monocytogenes* IAL 633 foi observado aumento significativo no nível de expressão de *inlA* ($P<0.001$) no caldo de peixe acrescido de D-glicose comparado ao caldo de peixe controle (Figura 9).

Figura 9. Expressão relativa do gene *inlA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Em relação ao gene *prfA*, foi observado um aumento na expressão para *L. monocytogenes* ATCC 19115 cultivada em caldo de carne acrescido da combinação de todos os ingredientes ($P < 0.001$), conforme figura 10.

Figura 10. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Listeria monocytogenes ATCC 19115 cultivada em caldo de peixe modelo apresentou uma redução significativa ($P < 0.05$) na expressão de *prfA*, em caldos acrescidos de NaCl, pimenta do reino, orégano e/ou combinação de ingredientes, quando comparada ao caldo de peixe controle (figura 11).

Figura 11. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Houve modulação da expressão gênica em *L. monocytogenes* IAL 633 na presença de glicose, pimenta do reino e orégano adicionados ao caldo de carne, causando uma redução ($P<0.05$) na expressão de *prfA* em comparação ao controle (Figura 12).

Figura 12. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Para o mesmo gene *prfA*, porém, em culturas de *L. monocytogenes* IAL 633, foi possível observar uma redução da expressão ($P<0,001$) nos caldos de peixe acrescidos de D-glicose, orégano e/ou combinação de ingredientes, comparando ao caldo de peixe controle, como representado na Figura 13.

Figura 13. Expressão relativa do gene *prfA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Para o gene que codifica a proteína polimerizadora de actina (*actA*) em *L. monocytogenes* ATCC 19115, foi possível observar que nos caldo de carne acrescidos de pimenta do reino e orégano houve aumento da expressão ($P<0.001$), quando comparando os com o caldo de carne controle. Já nos caldos de carne acrescidos dos ingredientes combinado foi observada redução significativa ($P<0.01$) quando comparado ao controle (Figura 14).

Figura 14. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes ATCC 19115 cultivada em caldos de peixe apresentou um aumento ($P<0.001$) na expressão do gene *actA* em caldo de peixe adicionado de pimenta do reino e orégano quando comparado ao controle. Porém, para o caldo de peixe acrescido de combinação de ingredientes, a expressão deste gene foi reduzida significativamente ($p<0.05$) em comparação ao controle (Figura 15).

Figura 15. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

Houve modulação da expressão gênica em *L. monocytogenes* IAL 633 quando o *actA* foi estudado em caldos de carne adicionados de D-glicose, NaCl, pimenta do reino, orégano e/ou combinação de ingredientes, com redução significativa ($P < 0.0001$) da expressão (Figura 16).

Figura 16. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

O gene *actA* de *L. monocytogenes* IAL 633 cultivadas em caldos de peixe acrescido de D-glicose apresentou aumento significativo da expressão ($P < 0,001$) quando comparado ao caldo de peixe controle (Figura 17).

Figura 17. Expressão relativa do gene *actA* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes ATCC 19115 em caldo de carne apresentou aumento ($P<0.001$) na expressão do gene *hly* quando cultivada em caldo de carne adicionado de NaCl, comparado ao controle. Porém, em caldo acrescido de orégano houve uma redução ($p<0.05$) na expressão de *hly* (Figura 18).

Figura 18. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes ATCC 19115 cultivada em caldo de peixe acrescido de orégano apresentou um aumento na expressão do gene *hly*, quando comparado ao caldo de peixe controle (Figura 19).

Figura 19. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* ATCC 19115 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes IAL 633, apresentou uma redução ($P < 0.05$) na expressão de *hly*, quando cultivada em caldos de carne adicionados de D-glicose, NaCl, pimenta do reino e orégano, em comparação com o controle (Figura 20).

Figura 20. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* IAL 633 no caldo de carne controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

L. monocytogenes IAL 633 quando cultivada em caldo de peixe apresentou aumento significativo ($P<0.05$) da expressão de *hly* na presença de D-glicose, quando comparado com o caldo de peixe controle figura 21.

Figura 21. Expressão relativa do gene *hly* de *L. monocytogenes* sorotipos IAL 633 no caldo de peixe controle (C) suplementando com D-glicose 0,5% (G), NaCl 4%, orégano 0,2% (O), pimenta do reino 0,2% (P) e combinação de todos os ingredientes (Co). Letras iguais indicam diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) em relação ao controle, sendo (a) aumento na expressão dos genes e (b) repressão genica.

6. Discussão

Fatores intrínsecos e extrínsecos dos alimentos podem aumentar ou diminuir a virulência de *L. monocytogenes*, e neste trabalho, a análise transcriptômica revelou que *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* responderam de maneira diversificada aos fatores de estresse e condições de cultivo estudados.

As análises por PCR em tempo real mostraram-se adequadas aos objetivos do presente trabalho e as curvas de fusão características dos amplicons obtidos (T_m) permitiram a confirmação da identidade desses produtos e ausência de contaminantes (CHENG et al., 2013). A T_m do gene *hly* é 81°C, enquanto que os genes *housekeeping* 16S *rRNA* e *bglA* de *L. monocytogenes* apresentam T_m entre 65°C a 97°C (NIU et al., 2014; TASARA; STEPHAN, 2007). No estudo realizado por Duodu et al. (2010) para análise da expressão dos genes de virulência de *L. monocytogenes*, os T_m s obtidos estavam entre 55°C e 95°C para os genes *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*, em concordância com valores obtidos no presente estudo.

L. monocytogenes IAL 633 apresentou reduzida expressão dos genes *prfA*, *actA* e *hly* em caldo de carne com glicose, em comparação com o controle. Segundo Jaradat e Bhuni (2002) a glicose é a melhor fonte de carbono para as bactérias e pode exercer efeito repressor sobre alguns genes de virulência. Heras et al. (2011) afirmaram que as fontes de carbono utilizadas por *L. monocytogenes* exercem um efeito significativo sobre a expressão dos genes de virulência, destacando que o gene *prfA* foi regulado negativamente por açúcares que são transportados via sistema fosfotransferase fosfoenolpiruvato-açúcar (PTS). Resultados parcialmente concordantes com a literatura foram obtidos no presente trabalho, pois a glicose foi capaz de reprimir a expressão do *prfA* em caldo de carne. No entanto para *L. monocytogenes* IAL 633 cultivada em caldo de peixe, a glicose ocasionou um aumento na expressão de *inlA*, *actA* e *hly*.

A glicose não alterou o perfil de expressão genica em *L. monocytogenes* ATCC 19115 e uma possível explicação para os diferentes comportamentos das linhagens é o fato que *L. monocytogenes* ATCC 19115 é mais patogênica e encontrada frequentemente em surtos de listeriose em seres humanos, já *L. monocytogenes* IAL 633 é mais frequentemente encontrada em alimentos, com maior capacidade de adaptação a diferentes matrizes alimentares (ORSI et al., 2011).

A presença de sal em alimentos é muito comum, devido à capacidade de inibir o crescimento bacteriano, conferir sabor, melhorar a textura e até mesmo prolongar a vida de prateleira dos alimentos (BAE et al., 2012). Nos caldos modelos de carne acrescidos de NaCl, foi observada uma redução na expressão dos genes *inlA*, *actA* e *hly* em *L. monocytogenes* IAL 633, mas para *L. monocytogenes* ATCC 19115 houve aumento na expressão de *hly*. Rantsiou et al. (2012) realizaram um trabalho para avaliação da expressão dos genes de virulência de *L. monocytogenes* em varias matrizes alimentares, e relataram que o gene *hly* foi mais expresso em uma matriz alimentícia à base de carne.

Neste trabalho, em ambos os caldos modelos com NaCl, houve redução na expressão *inlA* e *prfA* para *L. monocytogenes* ATCC 19115. Porém quando foram analisados os resultados obtidos para *L. monocytogenes* IAL 633 em caldo de peixe adicionado de NaCl, foi observada menor expressão de *prfA*. Bae et al. (2012), avaliaram a expressão global dos genes de *L. monocytogenes* quando incubada em caldo BHI suplementado com 1,2% de NaCl, mostrando que a expressão de quatro genes foi induzida, enquanto que 24 genes foram regulados negativamente.

Garner et al. (2006) também demonstraram que presença de NaCl, pH alto e ácidos orgânicos podiam aumentar a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* em alimentos formulados.

Alguns estudos têm demonstrado a atividade antimicrobiana de orégano e seus dois principais componentes, o carvacrol e o timol (APOSTOLIDIS, KWON, SHETTY, 2008; AHN et al., 2004), contudo não foi avaliada a expressão gênica bacteriana. Foi observado no presente trabalho que a presença de orégano em caldo de carne, regulou positivamente o *actA* e reduziu a expressão de *hly* em *L. monocytogenes* ATCC 19115. A redução da expressão também foi visível para os genes *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly* para *L. monocytogenes* IAL 633 na presença de orégano. Em caldo de peixe com orégano, houve redução na expressão de *inlA* e *prfA*, e aumento na expressão de *actA* e *hly* quando *L. monocytogenes* ATCC 19115 foi cultivada. Em contrapartida *L. monocytogenes* IAL 633 em caldo de peixe apresentou redução da expressão gênica somente para o gene *prfA*.

Outro condimento estudado, a pimenta do reino, ocasionou aumento da expressão do gene *actA* para *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldo de carne. Entretanto, resultado diverso foi obtido para *L. monocytogenes* IAL 633, que diminuiu a expressão dos genes *actA*, *inlA*, *prfA* e *hly*. A pimenta do reino também causou aumento na expressão do gene *inlA* e *actA*, e reduziu a expressão de *prfA* em *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldos de peixe quando comparado aos seus respectivos caldos controles.

A combinação de condimentos empregada no presente estudo aumentou os níveis de expressão do gene de *inlA* e *prfA*, além de reduzir a expressão do gene *actA* em *L. monocytogenes* ATCC 19115. Para as culturas de *L. monocytogenes* IAL 633 houve redução da expressão dos genes *inlA* e *actA* em relação ao caldo de carne puro. Todos os ingredientes combinados no caldo de peixe reduziram significativamente o nível de expressão dos genes *inlA*, *prfA* e *actA* em *L. monocytogenes* ATCC 19115. Essa redução ocorreu também na expressão do gene *prfA* em *L. monocytogenes* IAL 633 em caldo de peixe.

A utilização de diferentes formulações de alimentos influenciou a expressão gênica em *L. monocytogenes*, mas não foi observado um padrão de resposta em função dos fatores avaliados, o que indica a complexidade da regulação da virulência desta bactéria.

7. Conclusões

- O estudo da expressão dos genes *prfA*, *inlA*, *actA* e *hly* realizado nos caldos modelos de carne e peixe com diferentes formulações mostrou que o potencial virulento de *L. monocytogenes* é modulado por ingredientes de ocorrência comum em alimentos e varia em função da linhagem bacteriana estudada.
- A maior influência na expressão foi para os genes *inlA*, *actA* e *hly* observados em caldo de peixe, com modulação positiva na presença de glicose, com aumento de aproximadamente quatro mil vezes em relação ao controle, para *L. monocytogenes* IAL 633 (sorotipo 1/2a).
- Em algumas condições, para as duas linhagens de *L. monocytogenes* estudadas (sorotipo 1/2a e 4b) e em ambos os caldos, foi observada redução de cerca de cinco vezes na expressão dos genes *inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*, na presença de cloreto de sódio, orégano e mistura de ingredientes.
- A capacidade de *L. monocytogenes* alterar rapidamente a expressão de genes de virulência em resposta a diferentes estímulos ambientais tem implicações importantes para a garantia da inocuidade de alimentos e, foi possível observar um padrão de repressão dos genes alvos (*inlA*, *prfA*, *actA* e *hly*) na presença de pimenta do reino e orégano em caldo de carne para *L. monocytogenes* IAL 633.

- É importante ressaltar que a modulação da expressão dos genes de virulência de *L. monocytogenes* pode diferir em mais de 1000 vezes em função das matrizes alimentares, com importantes implicações para a garantia da inocuidade de alimentos.

8. Referências bibliográficas

AHN, J.; GRÜN, I.U.; MUSTAPHA, A. Antimicrobial and antioxidant activities of natural extracts in vitro and in ground beef. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 148–155, 2004.

ALVES, V.F.; LAVRADOR, M.A.S.; MARTINIS, E.C.P. Bacteriocin exposure and food ingredients influence in growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v. 23, p. 201-217, 2003.

APOSTOLIDIS, E., KWON, W.I.; SHETTY, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by oregano, cranberry and sodium lactate combination in broth and cooked ground beef systems and likely mode of action through proline metabolism. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 317–324, 2008.

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, n. 5, p. 906-912, 2012.

BAKKER, C.H.; WARCHCKI, S.; WRIGHT, M.E.; ALLRED, F.A.; ALSTROM, C.; MANUEL, S.C.; STASIEWICZ J.M.; BURRELL, A.; ROOF, S.; STRAWN, K.L.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K.K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 1882-1889, 2014.

BHUNIA, A.K. **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**, p. 165-182, 2008.

BIERN, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N.; COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1156-1166, 2007.

BUENO, V.F.; BANERJEE, P.; BANADA, P.P.; 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.

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. Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 1-8, 2011.

CHENG, J.; JIANG, Y.; RAO, P.; WU, H.; DONG, Q.; WU, Z.; DING, X.; GUO, J. Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen. **Archives of Virology**, v. 158, p. 379-386, 2013.

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.

COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 1041-1050, 2008.

CROUCHER, J.N.; THOMSON, R.N. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 619-624, 2010.

CRUZ, D.C.; MARTINEZ, B.M.; DESTRO, T.M. *Listeria monocytogenes*: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimento e Nutrição**, v.19, n.2, p. 195-206, 2008.

CURTIS, D.; HILL, A.; WILCOCK, A.; CHARLEBOIS, S. Foodborne and waterborne pathogenic bacteria in selected organization for economic cooperation and development (OECD) countries. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 10, 2014.

DAITA, A.; KOTHARY, M.H. Effects of Glucose, Growth Temperature, and pH on Listeriolysin O Production in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3495-3497, 1993.

DUODU, S.; HOLST-JENSEN, A.; KJERDAL, 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.

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

GAO, W.; ZHANG, W.; MELDRUM, R.D. RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 85, n. 3, p. 221-227, 2011.

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.

GOMES, C.B.; FRANCO, G.D.B.; MARTINIS, P.C.E. Microbiological food safety issues in Brazil: bacterial pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 10, n. 3, p. 197-205, 2013.

HERAS L.A.; CAIN, J.R.; BIELECKA, K.M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. Regulation of *Listeria* virulence: *prfA* master and commander. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 118-127, 2011.

HERIGSTAD, B.; HAMILTONA M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiology Methods**, v. 44, p. 121-129, 2001.

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.

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.

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.

JIANG, L.; OLESEN, I.; ANDERSEN, T.; FANG, W.; JESPERSEN, L. Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal system and transcriptional profiling of stress- and adhesion-related genes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 3, 2010.

JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; PALMU, L.; HONKANEN-BUZALKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 111-119, 1999.

KRAMARENKO, T.; ROASTO, M.; MEREMAE, K.; KUNINGAS, M.; PÕLTSA, P.; ELIAS, T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 24-29, 2013.

LIGOWSKA, M.; COHN, M., T.; STABLER, R.A.; WREN, B.W.; BRØNDSTED, L. Effect of chicken meat environment on gene expression of *Campylobacter jejuni* and its relevance to survival in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. S111–S115, 2011.

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.

MARQUES, E.; YANO, T. Influence of environmental conditions on the expression of virulence factors by *Listeria monocytogenes* and their use in species identification. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 63-70, 2004.

MARTIN, B.; PERICH, A.; GOMEZ, D.; YANGUELA, J.; RODRIGUEZ, A.; GARRIGA, M.; AYMERICH, T. Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants Belen. **Food Microbiology**, v. 44, p. 119-127, 2014.

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 Bacteriology**, v. 189, p. 473-490, 2007.

O'GRADYA, J.; SEDANO-BALBÁSB, S.; MAHERB, M.; SMITHC, M.; BARRYA, T. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 75-84, 2008.

OLESEN, I.; THORSEN, L.; JESPERSEN, L. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 60-68, 2010.

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.

OLESEN, I.; VOGENSEN, F.K.; JESPERSEN, L. Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. **International**

Journal of Food Microbiology, v. 141, p. 60-68, 2010.

ONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R.; KNIEL, K.E., **Food Microbiology an Introduction: *Listeria monocytogenes***, 3ed. p. 189-202, 2012.

RANTSIU, K.; MATARAGASB, M.; JESPERSENC, L.; ALESSANDRIA, V.; COCOLINA, L. Expression of virulence genes of *Listeria monocytogenes* in food,

Journal of Food Safety, v. 32, p. 161-168, 2012.

RANTSIU, K.; MATARAGASB, M.; JESPERSENC, L.; COCOLINA, L. Understanding the behavior of foodborne pathogens in the food chain: New information for risk assessment analysis, **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. S21–S29, 2011.

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.

SANT'ANA, S.A.; FRANCO, M.G.D.B. Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 4, p. 266-276, 2009.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, M, R.; ANGULO, J, F.; TAUXE, V, R.; MARC-LAIN, W.; ROY, L, S.; JONES, L, J.; GRIFFIN, M, P. Foodborne illness acquired in the United States Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, 2011.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS) Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 5, n. 6, 28/12/2005.

SILVA, V.C.; CRUZ, L.; ARAUJO, S.N.; ANGELONI, B.M.; FONSECA, B.B.; GOMES, O.A.; CARVALHO, R.F.; GONC, R.L.A.; BARBOSA, F.B. A glance at *Listeria* and *Salmonella* cell invasion: Different strategies to promote host actin polymerization. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, p, 19-32, 2012.

SUO, Y.; LIU, Y.; ZHOU, X.; HUANG, Y.; SHI, C.; MATTHEWS, K.; SHI, M. Impact of sod on the expression of stress-related genes in *Listeria monocytogenes* 4b G with/without paraquat treatment. **Journal of Food Science**, v. 79, 2014.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1236-1243, 2007.

TASARA, T.; STEPHAN, R. Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 269, p. 265–272, 2007.

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.

TRAVIER, L.; GUADAGNINI, S.; GOUIN, E.; DUFOUR, A.; CHENAL-RANCISQUE, V. *actA* Promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. **PLoS Pathogens**, v. 9, 2013.

VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS, 2013. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/197-secretaria-svs/11955-boletins-epidemiologicos-arquivo>. Acessado em: 04/12/2014.

WERBROUCK, H.; BOTTELDOOM, N.; UYTTENDAELE, 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, 2007.

WERBROUCK, H.; VERMEULEN, A.; VAN COILLIE, E.; MESSENS, W.; HERMAN, L.; DEVLIEGHERE, F.; UYTTENDAELE, M. Influence of acid stress on survival, expression of virulence genes and invasion capacity into Caco-2 cells of *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 140-146, 2009.

YANGA, H.; QU, L.; WIMBROWA, A.N.; JINGA, X.; SUN, Y. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, p. 132-138, 2007.