UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Expressão gênica e potencial de virulência de *Listeria monocytogenes* isolada de casos clínicos e alimentos submetida a estresse osmótico

Vinicius Buccelli Ribeiro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Expressão gênica e potencial de virulência de *Listeria monocytogenes* isolada de casos clínicos e alimentos submetida a estresse osmótico

Vinicius Buccelli Ribeiro

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2012

Vinicius Buccelli Ribeiro

Expressão gênica de *Listeria monocytogenes* isolada de casos clínicos e alimentos submetida a estresse osmótico

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^ª. Dra. Maria Teresa Destro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Agradecimentos

À Prof.^a Maria Teresa Destro pela oportunidade, confiança, incentivo, amizade, parceria e principalmente por todos os ensinamentos ao longo desses dez anos que estou no laboratório.

À Fundação de Amparo de Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsas de estudo desde a iniciação científica até o doutorado, além de todo o suporte financeiro aos projetos de pesquisa. Sem todo esse apoio nada seria possível. Muito Obrigado!

Às Prof. Dra. Mariza Landgraf e Prof. Dra. Bernadette Franco pela confiança, amizade e convívio.

Ao Dr. Martin Wiedmann e à Dra. Kathryn Boor pela oportunidade, ensinamentos e suporte técnico durante a minha estadia na Cornell University (USA).

À Dra. Marina B. Martinez pelo apoio técnico e disponibilização do laboratório para os ensaios de invasão celular.

Ao Prof. Dr. Sérgio Verjoviski, por ceder o scanner de microarray.

Ao Prof. Dr. Ernesto Hofer e à Dra. Eneida Marques por cederem algumas cepas ao projeto de pesquisa.

À Dra. Camila Guindalini e à Dra. Marina B. Martinez pelos comentários e sugestões durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Renato Orsi pela ajuda inestimável nas ferramentas biotecnológicas e também pelos comentários e participação no exame de qualificação.

À Dr. Teresa Bergholz e Sana Mujahid pelo apoio técnico durante a minha estadia na Cornell University.

À Kátia Leani pela amizade, parceria e por toda ajuda dispensada ao longo dos últimos dez anos.

Às amigas Maria Fernanda e Verena pela amizade e por toda ajuda oferecida durante o projeto de pesquisa. Muito obrigado!

Aos amigos que passaram e que continuam no laboratório de microbiologia de alimentos: Lúcia, Matheus, Rafael, Maria Crystina, Isabela, Martha, Aline, Ana Carolina, Paty, Vanessa, Slavi e André.

Aos alunos e amigos do Food Safety Lab. que me ajudaram bastante durante os três meses que permaneci morando nos EUA.

À Elaine e Jorge da secretaria de Pós-graduação pela atenção dedicada e serviços prestados.

À Mônica, Cleonice e Edílson da Secretaria do Departamento pela atenção e serviços prestados.

Ao pessoal do Berimball e Mackenzie pela amizade, momentos de descontração e lazer ao longo dos últimos anos, vocês são fundamentais.

Aos meus pais Carlos e Mônica por toda a base e educação que me deram e também pelos incentivos ao longo da vida. Cheguei até aqui por méritos meus e também de vocês!!!

À toda a minha família pelo suporte e amor, pois mesmo sem entenderem muito o que faço, nunca deixam de incentivar e se alegrar com cada conquista.

Um agradecimento mais do que especial para a mulher mais linda, inteligente, carinhosa e batalhadora que conheço. Sem o seu apoio, companheirismo e amizade o caminho teria sido muito mais árduo. Te AMO Roberta!!!

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superar qualquer obstáculo, mas independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

RESUMO

RIBEIRO, V.B. **Expressão gênica e potencial de virulência de *Listeria monocytogenes* isolada de casos clínicos e alimentos submetida a estresse osmótico.** 2012. 104p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O controle de *Listeria monocytogenes* (Lm) nas plantas processadoras de alimentos é uma tarefa difícil, devido à sua capacidade em formar biofilmes e se adaptar às condições adversas do ambiente. A sobrevivência a altas concentrações de cloreto de sódio, além da multiplicação em temperaturas de refrigeração são outras duas importantes características de isolados de Lm, incluindo os dois sorotipos mais prevalentes da espécie (4b e 1/2a). Os objetivos deste estudo foram avaliar o comportamento de multiplicação, da expressão gênica global e da virulência dos dois principais sorotipos de Lm em ambientes de estresse encontrados por esses micro-organismos na indústria de alimentos. Para tanto, 22 cepas de Lm - 12 isoladas de casos clínicos (seis cepas sorotipo 4b e seis sorotipo 1/2a) e 10 isoladas de alimentos (seis sorotipo 4b e quatro sorotipo 1/2a) - além de uma cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A e outra de *Listeria innocua*, foram inoculadas em caldo BHI com atividade de água (a_w) 0,94 (11% NaCl) e incubadas a 4°C, 10°C e 25°C durante 73, 42 e 15 dias, respectivamente. A 4°C, a maior parte das cepas, tanto clínicas como de origem alimentar, conseguiu se manter viável ou ainda se multiplicar e aumentar até 2 log UFC/ml a partir da população inicial. Já a 10°C, a maioria das cepas conseguiu se multiplicar, porém diferenças significativas ($p < 0,05$) na duração da fase lag entre as cepas dos sorotipos 1/2a e 4b, independentemente da origem das mesmas, foram observadas ($\text{lag}_{1/2a} > \text{lag}_{4b}$). Diferenças estatísticas também foram observadas no que diz respeito às cepas de Lm sorotipo 4b, quando incubadas a 25°C em meio de cultura BHI com a_w 0,94, apresentando maiores taxa de multiplicação e concentração populacional máxima ($p < 0,05$) em comparação às cepas de Lm sorotipo 1/2a submetidas às mesmas condições. Já com relação ao potencial de virulência das cepas, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os sorotipos com relação a sua capacidade hemolítica, entretanto, a capacidade de invasão das cepas sorotipo 4b em células Caco-2 foi maior ($p < 0,05$) em comparação ao sorotipo 1/2a. Além disso, análises comparativas pré e pós-estresse osmótico confirmaram o aumento no potencial de invasão ($p < 0,05$) tanto das cepas sorotipo 1/2a, quanto 4b após o contato com elevadas concentrações de sal. O papel dos reguladores de transcrição Sigma B e PrfA na sobrevivência de *Listeria monocytogenes*, sob condição de estresse osmótico, também foi avaliado. Ensaios de *microarray* com cepas das linhagens I e II demonstraram maiores níveis de transcrição para 173 e 68 genes, respectivamente, na cepa selvagem quando comparada à cepa mutante ΔsigB , incluindo genes relacionados à virulência (internalinas), sobrevivência a condições de estresse e metabolismo. Os resultados obtidos confirmam a habilidade de cepas de Lm se manterem viáveis ou mesmo se multiplicarem em baixas temperaturas, bem como em ambientes com elevada pressão osmótica, independentemente do sorotipo ou origem, enfatizando a necessidade de tomada de medidas efetivas de controle desse patógeno pela indústria de alimentos uma vez que cepas de Lm podem, além de sobreviver às condições adversas, ter seu potencial de virulência aumentado. Os dados obtidos também indicam a necessidade de mais estudos de avaliação comportamental e viabilidade de Lm em ambientes com concentração de sal modificada, uma vez que a discussão sobre a diminuição nos teores de sal em alimentos vem ganhando importância mundialmente.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, expressão gênica, *microarray*, virulência.

ABSTRACT

RIBEIRO, V.B. **Gene expression and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical sources and food and submitted to osmotic stress.** 2012. 104p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The control of *Listeria monocytogenes* (Lm) in food processing plants is difficult due to its ability to form biofilms and adapt to adverse environmental conditions. The survival at high concentrations of sodium chloride and growing at low temperatures are two other important features of Lm isolates, including the two most prevalent serotypes (1/2a and 4b). The objectives of this study were to evaluate the growing behavior, global gene expression profile and virulence potential of the two main serotypes of Lm under osmotic stress environments encountered by these microorganisms in the food industry. 22 Lm strains - 12 isolated from clinical cases (six strains serotype 4b and six serotype 1/2a) and 10 isolated from food (six serotype 4b and four serotype 1/2a) - plus one *L. monocytogenes* Scott A and one *Listeria innocua* were inoculated into BHI broth with water activity (aw) 0.94 (11% NaCl) and were incubated at 4°C, 10°C and 25°C during 73, 42 and 15 days respectively. At 4°C, the majority of strains both clinical and food were able to remain viable and to grow (up to 2 log CFU/ml). At 10°C, most strains could grow but significant differences ($p < 0.05$) on the lag phase duration between the serotypes 1/2a and 4b strains, regardless their origin, were observed ($\text{lag}_{1/2a} > \text{lag}_{4b}$). Statistical differences were also observed related to Lm serotype 4b strains when grown in BHI with aw 0.94 at 25°C, that showed higher maximum growth rate and final density ($p < 0.05$) compared to Lm serotype 1/2a strains. Regarding the virulence potential, there were no statistical differences among serotypes with respect to its hemolytic activity, however, the invasiveness of serotype 4b strains in Caco-2 cells was higher ($p < 0.05$) than serotype 1/2a. Furthermore, comparative analyzes before and after osmotic stress confirmed the increased potential for invasion ($p < 0.05$) in both serotypes (1/2a and 4b) after being submitted to high salt concentrations. The role of transcription regulators sigma B and PrfA in *L. monocytogenes* survival under osmotic stress condition was also evaluated. Microarray assay using lineage I and II strains showed increased transcription levels in 173 and 68 genes, respectively, when comparing the wild type strains to the mutant ΔsigB strain. This included genes related to virulence (internalina), survival under stress conditions and metabolic genes. The results confirm the ability of Lm strains in remain viable or even grow at low temperatures and in high osmotic pressure environments, regardless of serotype or origin. They also emphasize the need for effective measures to control this pathogen by food industry since it is possible that Lm strains survive under adverse conditions and also increase its virulence potential. The data also indicate the need for additional studies regarding the behavior of Lm in environments with modified sodium chloride concentration since the discussion about salt levels in foods is increasing worldwide.

Key words: *Listeria monocytogenes*, gene expression, microarray, virulence.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética obtida pelo método estatístico de *maximum likelihood* a partir das sequências concatenadas obtidas dos genes *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA* para as cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II..... **36**
- Figura 2.** Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água a 4°C..... **39**
- Figura 3.** Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água a 10°C..... **41**
- Figura 4.** Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água a 25°C..... **44**
- Figura 5.** Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 4°C..... **45**
- Figura 6.** Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 4°C..... **47**
- Figura 7.** Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 4°C..... **48**
- Figura 8.** Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 10°C..... **50**
- Figura 9.** Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 10°C..... **53**
- Figura 10.** Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 10°C..... **54**
- Figura 11.** Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 25°C..... **56**
- Figura 12.** Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 25°C..... **59**

Figura 13. Curvas de multiplicação das cepas <i>L. monocytogenes</i> Scott A e <i>L. innocua</i> quando cultivadas em caldo BHI com <i>aw</i> 0,94 a 25°C.....	60
Figura 14. Curvas de multiplicação das cepas <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e 1/2b e suas respectivas mutantes isogênicas ($\Delta sigB$, $\Delta prfA$ e $\Delta sigB\Delta prfA$) quando cultivada em caldo BHI com <i>aw</i> 0,94 a 25°C.....	64
Figura 15. Curvas de multiplicação das cepas <i>L. monocytogenes</i> 1/2b e sua mutante isogênica $\Delta sigB$, quando cultivada em caldo BHI com <i>aw</i> 0,94 a 25°C com populações iniciais elevadas.....	66
Figura 16. Eficiência de invasão das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas em células Caco-2.....	83
Figura 17. Eficiência de invasão em células Caco-2 de cepas de <i>L. monocytogenes</i> cultivadas em condições normais e submetidas ao estresse osmótico.....	84
Figura 18. Eficiência de invasão em células Caco-2 de cepas de <i>L. monocytogenes</i> , selvagens e mutantes $\Delta sigB$, cultivadas em condições normais.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de alimentos em categorias por grupos de risco de veiculação de listeriose	18
Tabela 2. Identificação das cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas no projeto de pesquisa.....	22
Tabela 3. Cepas selvagens e mutantes de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas para alguns dos ensaios fenotípicos e genotípicos.....	22
Tabela 4. Sequências e tamanho dos <i>amplicons</i> dos <i>primers</i> utilizados na amplificação dos genes <i>housekeeping</i> de <i>L. monocytogenes</i> para a técnica de MLST.....	24
Tabela 5. Genes selecionados e seus respectivos <i>primers</i> e sondas utilizados para avaliação dos níveis de expressão gênica com RT-PCR <i>real time</i>	31
Tabela 6. Parâmetros de multiplicação das 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i> sorotipo 4b e 1/2a isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos, quando incubadas em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 10°C.....	52
Tabela 7. Parâmetros de multiplicação das 22 cepas de <i>L. monocytogenes</i> sorotipo 4b e 1/2a isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos, quando incubadas em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	58
Tabela 8. Parâmetros de multiplicação das oito cepas de <i>L. monocytogenes</i> 1/2b e 1/2a, quando incubadas em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	65
Tabela 9. Genes regulados positivamente por σ^B na cepa de <i>L. monocytogenes</i> linhagem I quando cultivada em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	68
Tabela 10. Genes regulados positivamente por σ^B na cepa de <i>L. monocytogenes</i> linhagem II quando cultivada em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	73
Tabela 11. Genes regulados positivamente por σ^B de acordo com sua categoria funcional nas cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagens I e II quando cultivada em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	76
Tabela 12. Genes regulados por σ^B , determinados por <i>microarray</i> e confirmados por RT-PCR <i>real time</i> , nas cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagens I e II quando cultivadas em caldo BHI (<i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	78

Tabela 13. Genes regulados positivamente por σ^B nas cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagens I e II, cultivadas em caldo BHI (<i>aw</i> 0,99) sob estresse osmótico (BHI <i>aw</i> 0,94) a 25°C.....	79
Tabela 14. Atividade hemolítica das cepas de <i>L. monocytogenes</i> isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos.....	80
Tabela 15. Atividade hemolítica das cepas de <i>L. monocytogenes</i> selvagens e suas respectivas mutantes.....	81
Tabela 1. (Anexo) Genes identificados e regulados positivamente por σ^B nas cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagens I e II deste estudo em comparação com outros estudos de expressão gênica global.....	99

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	21
3.2 Avaliação da similaridade genética de <i>L. monocytogenes</i> por <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST).....	23
3.3 Avaliação do efeito do estresse osmótico na multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes temperaturas.....	25
3.4 Avaliação comportamental de <i>L. monocytogenes</i> cultivada em ambiente com elevado estresse osmótico e em diferentes temperaturas.....	26
3.5 Avaliação da multiplicação das cepas <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e 1/2b e suas respectivas mutantes isogênicas (<i>ΔsigB</i> , <i>ΔprfA</i> e <i>ΔsigBΔprfA</i>), sob estresse osmótico a 25°C.....	27
3.6 Extrações de RNA.....	28
3.7 Análise da expressão gênica em cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagem I e II.....	28
3.8 Confirmação da expressão gênica por RT-PCR <i>real time</i>	30
3.9 Avaliação da atividade hemolítica de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	32
3.10 Avaliação da capacidade invasiva de <i>L. monocytogenes</i> em modelo de células epiteliais.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Avaliação da similaridade genética de <i>L. monocytogenes</i> por <i>MultiLocus Sequence Typing</i> (MLST).....	35
4.2 Avaliação do efeito do estresse osmótico na multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em diferentes temperaturas.....	37
4.3 Avaliação comportamental de <i>L. monocytogenes</i> cultivada em ambiente com elevado estresse osmótico e em diferentes temperaturas.....	44
4.4 Avaliação da multiplicação das cepas <i>L. monocytogenes</i> 1/2a e 1/2b e suas respectivas mutantes isogênicas (<i>ΔsigB</i> , <i>ΔprfA</i> e <i>ΔsigBΔprfA</i>), sob estresse osmótico a 25°C.....	62
4.5 Análise da expressão gênica em cepas de <i>L. monocytogenes</i> linhagem I e II.....	67
4.6 Avaliação da atividade hemolítica de cepas de <i>L. monocytogenes</i>	79
4.7 Avaliação da capacidade invasiva de <i>L. monocytogenes</i> em modelo de células epiteliais.....	82
5. CONCLUSÕES.....	87
6. REFERÊNCIAS.....	88
7. ANEXOS.....	99

1. INTRODUÇÃO

O número crescente e a gravidade das doenças de origem alimentar, podendo atingir anualmente até 30% da população em países desenvolvidos (WHO, 2007), têm aumentado consideravelmente o interesse de entidades governamentais, indústrias e consumidores em relação à segurança sanitária dos alimentos. Qualquer pessoa pode contrair este tipo de doença provocada por agentes infecciosos ou toxigênicos que entram no organismo através da ingestão de alimentos (JAY et al., 2005).

Além do prejuízo social decorrente de doenças ocasionadas por contaminação de alimentos, devem ser levados em conta outros fatores, tais como os custos de devoluções de produtos, perda de confiança dos consumidores e potenciais custos de indenizações, com enorme prejuízo econômico para as empresas que operam neste ramo (JAY et al., 2005).

Alguns dos mais importantes perigos para a segurança dos alimentos são de natureza microbiológica (FAO/WHO, 2003). Um dos tipos de degradação dos alimentos que pode ocorrer está relacionada à ação de micro-organismos que naturalmente os utilizam como a sua fonte de nutrientes, tornando-os impróprios para consumo. Muitas vezes, embora a degradação do alimento ainda não seja perceptível, este pode se encontrar de tal forma contaminado que o seu consumo pode originar doenças no consumidor se estiverem presentes micro-organismos patogênicos ou ainda as suas toxinas (JAY et al., 2005).

Embora genericamente conhecidas como toxinfecções alimentares, as doenças transmitidas por alimentos de uma forma geral podem ser classificadas como infecções (doenças que resultam da ingestão de alimentos contendo micro-organismos vivos prejudiciais), intoxicações (doenças causadas quando as toxinas estão presentes no alimento ingerido, mesmo que os micro-organismos que as produziram tenham sido eliminados), ou toxinfecções (doença causada pela produção da toxina após a ingestão do alimento, quando este possui uma determinada quantidade de micro-organismos, que as produzem ou libertam depois de ingeridos) (JAY et al., 2005). No caso da listeriose, doença causada pelo micro-organismo patogênico *Listeria monocytogenes*, trata-se de uma infecção resultante da ingestão de alimentos contendo organismos vivos prejudiciais.

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, desprovida de cápsula, apresenta motilidade por meio de flagelos peritríquios, não formadora de esporos e anaeróbia facultativa (RYSER e MARTH, 2007). Apresenta-se na forma de bastonetes curtos, regulares com extremidades arredondadas e de dimensões entre 0,5 a 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro (VOS et al., 2009). Culturas antigas ou expostas a condições adversas como, por exemplo, no caso de choque osmótico, podem apresentar células mais alongadas, finas e filamentosas (RYSER e MARTH, 2007).

O desenvolvimento de novos métodos de biologia molecular permitiu uma melhor caracterização e organização taxonômica dentro do Gênero *Listeria*, sendo que este pertence, juntamente com o Gênero *Brochothrix*, à Família *Listeriaceae*, Ordem *Bacillales*, Classe *Bacilli* e Filo *Firmicutes* (VOS et al., 2009).

O gênero *Listeria* consiste de oito diferentes espécies, incluindo: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* (GRAVES et al., 2010), *L. rocourtiae* (LECLERCQ et al., 2009). Enquanto *L. ivanovii* e *L. monocytogenes* são consideradas patogênicas para mamíferos, *L. ivanovii* é considerada rara e predominantemente patogênica para ruminantes. *L. monocytogenes* é a espécie mais comumente associada à doença tanto em animais quanto em humanos. Esta espécie é ubiqüitária, sendo seu habitat primário o solo e vegetação em decomposição, porém uma vez que a mesma consiga infectar um hospedeiro humano ou animal, pode ocasionar doença severa (ORSI et al., 2010).

Existem diversos métodos de tipagem que podem ser utilizados para caracterização de *L. monocytogenes*, por exemplo, os métodos fenotípicos (sorotipagem e fagotipagem) e os genotípicos (Ribotipagem, “Pulsed Field Gel Electrophoresis” – PFGE, “MultiLocus Sequence Typing” – MLST e “Polimerase Chain Reaction” - PCR) (RAGON et al., 2008). Todos estes métodos são de extrema importância do ponto de vista epidemiológico, uma vez que possibilitam a diferenciação entre as estirpes encontradas em alimentos suspeitos e aquelas isoladas de casos humanos (MALAK et al., 2001).

A sorotipagem proporciona uma forma útil e conveniente de classificar as diferentes estirpes de *L. monocytogenes* com base nos seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) existentes na superfície celular. Atualmente, este micro-organismo pode ser classificado em 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, e 7), distribuídos em quatro grupos (1/2, 3, 4 e 7) (ALLERBERGER, 2003; VOS et al., 2009).

Baseado em resultados obtidos com os principais métodos moleculares de subtipagem, a espécie *L. monocytogenes* pode ser subdividida em quatro linhagens (I, II, III e IV). As cepas da linhagem I são principalmente relacionadas aos casos de listeriose humana (GRAY et al., 2004), enquanto as cepas da linhagem II têm uma maior prevalência entre isolados de amostras ambientais, alimentos, e casos de listeriose animal (NIGHTINGALE et al., 2005a; SAUDERS et al., 2006). Já as cepas da linhagem III são raras e, principalmente, associadas aos animais (LIU et al., 2006). Evidências recentes sugerem que os isolados originalmente classificados na linhagem III representam um grupo polifilético, que inclui atualmente duas sublinhagens (IIIA e IIIC). A linhagem IV, antes classificada como IIIB, já foi isolada a partir de amostras clínicas, animais e alimentos (ROBERTS et al., 2006; LIU et al., 2006; ORSI et al., 2008).

As quatro linhagens de *L. monocytogenes* parecem estar bem correlacionadas com os sorotipos, ou seja, isolados da linhagem I representam os sorotipos 1/2b, 3b, 3c e 4b, enquanto isolados da linhagem II incluem os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a (NADON et al., 2001). Já os isolados das linhagens III e IV são representados pelos sorotipos 4a e 4c, entretanto, após a caracterização de um número maior de isolados, a existência de cepas do sorotipo 4b nestas linhagens também foi observada (WARD et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005a; WARD et al., 2008).

Apesar de isolados de todas as linhagens terem sido relacionados com listeriose humana, a maioria dos casos e surtos tem sido associada, principalmente, a isolados da linhagem I, especialmente ao sorotipo 4b (McLAUHLIN et al., 2004; JEFFERS et al., 2001). Por outro lado, isolados da linhagem II parecem estar associados a alimentos e fontes ambientais, e em menor proporção entre os casos clínicos em humanos (SAUDERS et al., 2006; GRAY et al., 2004). Estes dados sugerem que isolados da linhagem I são mais virulentos do que isolados da linhagem II, após análises e avaliações de riscos (CHEN et al., 2006), bem como por observações de que os isolados da linhagem I, em média, apresentam maior patogenicidade em culturas de tecidos em relação a isolados da linhagem II (WIEDMANN et al., 1997; NORTON et al., 2001; GRAY et al., 2004).

Embora a listeriose humana possa ser teoricamente causada por qualquer um dos 13 sorotipos (JEMMI e STEPHAN, 2006), representantes dos sorotipos 1/2a, 1/2b, e 4b estiveram envolvidos em aproximadamente 98% dos casos de listeriose humana registrados (JACQUET et al., 2002; SCHUCHAT et al., 1991). Mesmo sendo o sorotipo 1/2a (linhagem II) o mais frequentemente isolado de alimentos e fontes ambientais, a maioria dos surtos de

origem alimentar e a maioria dos casos esporádicos de listeriose são causadas por cepas do sorotipo 4b (linhagem I) (JEFFERS et al., 2001; JACQUET et. al., 2004).

1.2 Fatores que afetam a multiplicação e sobrevivência de *L. monocytogenes*

A indústria alimentícia tem desenvolvido novos produtos, lançando-os no mercado em uma velocidade impressionante, visando atender exigências do consumidor em relação ao paladar e principalmente à praticidade no preparo. As pessoas têm cada vez mais consumido alimentos fora de casa, ou se o fazem nos seus lares têm preferência por alimentos adquiridos porcionados, refrigerados, prontos ou semiprontos para o consumo, em que um leve aquecimento já é suficiente para torná-lo comestível.

O processamento de alimentos tem como principal objetivo a geração de produtos seguros e saudáveis que apresentem uma vida útil adequada, além de serem sensorialmente aceitáveis para o consumidor. Para alcançar este objetivo, os fabricantes recorrem a diferentes métodos de processamento para inativar ou inibir a multiplicação de micro-organismos patogênicos ou deteriorantes, sem que se alterem de maneira inadequada as características físicas e sensoriais dos alimentos. O sucesso desses processos depende do conhecimento, não só do produto em si, como das características dos micro-organismos que o podem contaminar. Como qualquer outra bactéria, *L. monocytogenes* é influenciada pelo meio em que se encontra. Alguns dos fatores que afetam a sua multiplicação e sobrevivência estão expostos a seguir.

1.2.1 Temperatura

A temperatura a que os alimentos são normalmente expostos pode ser propícia à multiplicação, preservação ou destruição dos micro-organismos. *Listeria monocytogenes* consegue se multiplicar entre 0 e 45°C, desde que presente em meio adequado (RYSER e MARTH, 2007). Temperaturas abaixo de 0°C congelam o meio de cultura ou alimento e acabam preservando ou apenas reduzindo esse agente patogênico. Embora não se observe a multiplicação em temperaturas abaixo de -1,5°C, este micro-organismo consegue sobreviver a temperaturas inferiores. O congelamento e o consequente armazenamento provocam inativação limitada de *L. monocytogenes*, portanto, a contaminação de alimentos congelados deve ser prevenida. Temperaturas acima dos 50°C, na grande maioria dos casos, são letais para *L. monocytogenes* (RYSER e MARTH, 2007).

Devido à ampla faixa de temperatura que permite a multiplicação de *L. monocytogenes*, a indústria alimentícia tem um grande interesse no levantamento de dados a respeito do comportamento desta bactéria em diferentes condições, principalmente em baixas temperaturas, uma vez que se trata de um micro-organismo psicotrófico. Isto quer dizer que o armazenamento de alimentos a temperaturas de refrigeração, método de preservação muito empregado pela indústria de alimentos e também na casa dos consumidores, retarda, mas não previne a multiplicação desta bactéria.

A temperatura ótima de multiplicação de *L. monocytogenes* está na faixa entre 30 e 37°C, entretanto, na ausência de componentes antimicrobianos, manter os alimentos entre 20 e 43°C permite a multiplicação rápida deste patógeno (RYSER e MARTH, 2007). Além disso, a temperatura de multiplicação parece ser um fator importante na variação da virulência de *L. monocytogenes*, pois uma vez que este micro-organismo é cultivado em temperaturas de refrigeração, ao invés de sua temperatura ótima, estirpes pouco virulentas podem se tornar consideravelmente virulentas (RYSER e MARTH, 2007).

Deve-se evitar também manter os alimentos a temperaturas elevadas, mas que ainda assim não sejam letais, uma vez que este patógeno pode ganhar resistência a processamentos térmicos subsequentes. De uma forma geral, as células de *L. monocytogenes* adaptadas ao calor são mais resistentes a outros fatores de stress em comparação com células submetidas a temperaturas ótimas de multiplicação (RYSER e MARTH, 2007).

1.2.2 pH

Tal como muitas outras bactérias, *L. monocytogenes* tem multiplicação ótima em pH próximo da neutralidade. Na ausência de outros fatores limitantes de multiplicação, as populações finais mais elevadas foram obtidas com pH entre 6,0 e 8,0. A multiplicação de *L. monocytogenes* tem sido descrita para valores de pH que variam de 4,0 a 9,6 (RYSER e MARTH, 2007). Aparentemente, as células de *L. monocytogenes* se recuperam melhor do estresse provocado por um meio alcalino do que por um meio ácido ou ainda por um choque osmótico (CHEROUTRE-VIALETTE, et al., 1998; VASSEUR, et al., 1999).

O pH reduzido é um dos determinantes mais críticos para a qualidade e segurança dos alimentos fermentados e acidificados. Embora a multiplicação de *L. monocytogenes* não tenha ainda sido documentada para valores inferiores a 4,0, este micro-organismo parece ser razoavelmente resistente a estas condições (ROGGA et al., 2005). Contudo, o efeito do pH na

viabilidade celular depende de outros fatores ambientais e do estado fisiológico do micro-organismo. Por exemplo, a ausência de multiplicação ou a diminuição da viabilidade celular, podem ser observadas em pH igual ou inferior a 5,5, quando outras condições ambientais, tais como a temperatura ou a concentração de sal, não são ótimas para a sobrevivência de *L. monocytogenes* (VIALETTE et al., 2003).

Os limites mínimos de pH que permitem a sobrevivência desta bactéria também dependem do tipo de ácido. A taxa de multiplicação de *L. monocytogenes* na presença de ácidos orgânicos varia consideravelmente com o tipo, concentração do ácido e pH do meio. Para valores iguais de pH e de concentrações de ácidos, o ácido acético foi estabelecido como o mais prejudicial para a multiplicação do micro-organismo, seguido pelo ácido láctico e o ácido cítrico. Estes ácidos orgânicos se mostraram como agentes bacteriostáticos mais potentes que o ácido clorídrico (VASSEUR et al., 1999; RYSER e MARTH, 2007).

1.2.3 Teor de sal e atividade de água (*aw*)

A melhor forma de expressar a disponibilidade de água para a multiplicação bacteriana é através do parâmetro atividade da água (*aw*). Os produtos “in natura” geralmente apresentam *aw* superior a 0,98. Como a maioria das bactérias, *Listeria monocytogenes* apresenta multiplicação ótima em valores de $aw \geq 0,97$. Ainda assim, esta sobrevive ou consegue mesmo se multiplicar em alimentos com *aw* relativamente baixa (valores próximos de 0,90), caracterizando-a como uma das mais resistentes a esse parâmetro quando comparada com outros agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos. (RYSER e MARTH, 2007).

Esta tolerância de *L. monocytogenes* a baixas *aw* deve ser levada em consideração pela indústria de alimentos quanto à aplicação de tecnologias que envolvam a desidratação ou a salmoura. A secagem e a adição de sal e/ou açúcar são métodos tradicionais para redução da *aw* nos alimentos e assim aumentar sua vida útil. No entanto, esta bactéria consegue tolerar concentrações de sal bastante elevadas, ao ponto de conseguir se multiplicar em concentrações de 10% de NaCl ou ainda sobreviver a uma concentração de 23,8% de NaCl, durante 259 dias (RYSER e MARTH, 2007).

Bergholz et al. (2010) demonstraram que a sobrevivência de *L. monocytogenes* em condições de estresse osmótico também é depende da temperatura, ou seja, em temperaturas mais baixas, a resistência a altas concentrações de NaCl, aumenta significativamente. Isto pode ser explicado, pois os mecanismos que contribuem para a resistência ao estresse

osmótico, tais como os transportadores glicina-betaína e carnitina, também desempenham um papel importante na capacidade de *L. monocytogenes* se multiplicar a baixas temperaturas. Estes pesquisadores sugerem ainda que são as estirpes mais frequentemente associadas à doença em humanos e animais, as mais resistentes ao estresse osmótico a 37°C, condições semelhantes às encontradas no trato gastrointestinal do hospedeiro.

Com o intuito de caracterizar e compreender o comportamento dos membros do gênero *Listeria*, principalmente com relação à predominância dos diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* em casos de listeriose humana e outros sorotipos em alimentos e ambiente, estudos utilizando diferentes condições ambientais (temperatura, pH, *aw*, etc.) têm sido realizados (BARBOSA et. al., 1994; FARBER et. al., 1992; BUNCIC et. al., 2001; LIU et. al., 2005).

Barbosa et al. (1994) estudaram a variação na taxa de multiplicação sob diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 37°C) entre espécies de *Listeria* utilizando 39 estirpes de *L. monocytogenes* e sete outras espécies do gênero. Eles verificaram que a 4°C as estirpes de *Listeria* sp. apresentaram elevação populacional, porém em uma velocidade menor do que aquela observada a 37°C. A densidade populacional foi menor nesta temperatura do que a 10°C e a 37°C. Por outro lado, as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram menor duração da fase lag, menor tempo de geração e a taxa de multiplicação foi maior a 4°C do que as outras espécies estudadas, entretanto, estas diferenças diminuíram à medida que a temperatura de incubação foi aumentada.

Begot et al. (1997) analisaram o aumento da população, tempo da fase lag e tempo de geração de 58 estirpes de *L. monocytogenes* e oito de *L. innocua*, isoladas de produtos cárneos e ambiente, frente a três fatores: temperatura (10°C e 37°C), atividade de água (*aw* – 0,96 e 1,00) e pH (5,6 e 7,0). Os autores concluíram que o aumento da população das 66 cepas foi maior (1,8 log) quando a *aw* foi de 1, temperatura de 37°C e pH de 7,0. O maior tempo médio da fase lag (28,2 horas) e o maior tempo médio de geração (13 horas) foram observados nas condições de *aw* 0,96, temperatura de 10°C e pH 7,0.

Buncic et al. (2001) analisaram 81 estirpes, isoladas de casos clínicos de listeriose e de alimentos, de diversos países e pertencentes aos sorotipos 1/2a e 4b, quanto ao seu comportamento frente a duas bacteriocinas em diferentes temperaturas e também ao tratamento térmico. Eles avaliaram ainda a patogenicidade das cepas empregando embriões de aves. Os autores observaram que as cepas do sorotipo 1/2a, analisadas em grupo,

apresentaram maior resistência às duas bacteriocinas do que as do sorotipo 4b, quando incubadas a 4°C. Por outro lado, após estocagem das cepas a 4°C, os isolados do sorotipo 4b apresentaram maior resistência a 60°C do que as do sorotipo 1/2a. Os pesquisadores também verificaram que as cepas do sorotipo 4b apresentaram uma tendência a menor fase lag e maior patogenicidade, quando transferidas de 4°C para a temperatura corporal (37°C), quando comparadas com o sorotipo 1/2a.

Lianou et al. (2006) estudaram a variação da taxa de multiplicação e a resistência de 25 cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos isoladas de alimentos, casos clínicos, animal e do ambiente, submetendo-as ao estresse ácido e ao tratamento térmico. Os resultados obtidos demonstraram que as cepas pertencentes ao sorotipo 4b, isoladas de casos clínicos, apresentaram maior resistência ao ácido quando comparadas com as cepas do mesmo sorotipo, porém de outras fontes. Por outro lado, menor resistência térmica foi observada nas cepas do sorotipo 4b, analisadas em grupo, quando comparadas com o conjunto das cepas dos outros sorotipos.

1.3 Listeriose

Listeriose é uma doença que tem origem a partir de uma infecção oportunista causada por *L. monocytogenes*. Além de afetar humanos, ela está associada também a doença em animais, especialmente ruminantes, manifestando-se clinicamente como encefalite ou infecção uterina (e consequente aborto) (NIGHTINGALE et al., 2004, 2005c). Contudo, os animais podem ser portadores e disseminar este micro-organismo em números significativos no ambiente. Em humanos, existem duas formas clínicas associadas à infecção por *L. monocytogenes*, a invasiva e a não invasiva. A forma invasiva é chamada de listeriose e ocorre normalmente em pessoas com sistema imune debilitado. A forma não invasiva da doença, menos grave, é chamada de gastroenterite febril, geralmente associada a sintomas gripais que podem ocorrer em pessoas saudáveis que tenham ingerido números elevados de células de *L. monocytogenes* (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

Além dos dois quadros citados anteriormente, pode ser observada a listeriose cutânea, que, tal como a gastroenterite febril, é auto-limitada. Apresenta-se como uma infecção cutânea eczematosa, causada por exposição direta de pele intacta a *L. monocytogenes*, provavelmente após o contato com animais doentes e/ou materiais infectados resultantes de aborto (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007). A ocorrência ou não de listeriose

depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe e da quantidade de células bacterianas ingeridas (DELGADO, 2008).

1.3.1. Formas clínicas e grupos de risco (listeriose invasiva e gastroenterite)

Devido à elevada taxa de mortalidade que pode atingir até 30% dos acometidos, ou ainda ser superior (DENNY e MCLAUHLIN, 2008), a listeriose está entre as causas mais frequentes de morte ocasionadas por doenças de origem alimentar (JEMMI e STEPHAN, 2006). As taxas de infecção mais elevadas são registradas em crianças com menos de um mês de idade e em adultos com mais de 60 anos. As mulheres grávidas representam cerca de 30% de todos os casos e as mesmas têm um risco estimado de desenvolver a doença cerca de 17 vezes superior ao dos outros grupos de risco (GOLDFINE e SHEN, 2007).

Quase 70% das infecções não perinatais ocorrem em indivíduos imunodeprimidos, por exemplo, doentes oncológicos, HIV positivos, transplantados, com patologia hepática ou diabéticos. Entretanto, pessoas saudáveis também podem desenvolver a forma invasiva da doença, particularmente aqueles com mais de 60 anos de idade (GOLDFINE e SHEN, 2007).

Nos idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos, a listeriose se manifesta principalmente sob a forma de infecção do Sistema Nervoso Central (SNC), com efeitos a longo prazo, como por exemplo, meningite e septicemia, com elevadas taxas de fatalidade (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Nas grávidas, os sintomas se confundem muitas vezes com gripes, sendo que pode ocorrer a propagação da infecção da mãe para o feto através da placenta. Um vez que o bebê seja submetido ao contato com o agente patogênico, poderá ocorrer aborto ao final do segundo trimestre ou, mais frequentemente, já no terceiro trimestre levar ao parto prematuro ou nascimento do bebê com patologias graves devido à septicemia generalizada (GOLDFINE e SHEN, 2007; DELGADO, 2008).

O período de incubação da doença em humanos é longo e bastante incerto podendo ir de 11 a 70 dias, ou até 90 dias, após contato com o agente patogênico, sendo em média entre 21 a 30 dias. A duração da doença é também variável necessitando na grande maioria dos casos intervenção médica (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; JEMMI e STEPHAN, 2006).

Apesar de ser uma forma menos frequente da doença, diversas pessoas acometidas com listeriose invasiva, tanto em casos esporádicos como em surtos, apresentaram histórico anterior de doença gastrointestinal acompanhada de febre, antes de se instalar meningite ou outro quadro clínico de listeriose invasiva (GOLDFINE e SHEN, 2007).

Os casos de listeriose gastrointestinal diferem dos de listeriose invasiva por apresentarem menor tempo de incubação e pelos sintomas mais brandos. A doença ocorre tipicamente 24 horas (entre 6 horas até 10 dias) após a ingestão de grandes quantidades de bactérias e normalmente tem duração média de 1 a 3 dias (entre 1 e 7 dias), sendo auto-limitante. Os sintomas mais comuns incluem febre, diarreia aquosa, náuseas, dores de cabeça, dores nas articulações e musculares (SWAMINATHAN e GERNER-SMIDT, 2007).

1.3.2. Patogenicidade

Na grande maioria dos casos, a infecção começa após a ingestão de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*. Após a ingestão da bactéria por um hospedeiro susceptível, ela é capaz de fazer uma transição para um estado fisiológico que promove a sua sobrevivência e replicação nas células hospedeiras (FREITAG et al., 2009).

A alcalinização do estômago com antiácidos, bloqueadores da produção de suco gástrico, ou cirurgias de úlceras podem facilitar a infecção (GOLDFINE e SHEN, 2007). Já no intestino, *L. monocytogenes* consegue ultrapassar a barreira mucosa, através da endocitose ativa das células endoteliais. Existem modelos tanto intra-gástricos, como intravenosos para a infecção por *L. monocytogenes* em camundongos, porcos da índia e macacos (BAKARDJIEV et al., 2004; LECUIT, 2007; FREITAG et al., 2009).

L. monocytogenes tem a habilidade de induzir a própria fagocitose pela célula do hospedeiro, multiplicar-se e invadir as células adjacentes (DOYLE, 2001). É reconhecidamente um patógeno invasivo que, para cumprir todo o ciclo de vida intracelular - fagocitose induzida pelo próprio micro-organismo, lise do vacúolo fagocítico, locomoção no citoplasma e disseminação pelas células vizinhas - se utiliza de fatores de virulência que podem variar entre as cepas (LIU et al., 2007).

Após a colonização do trato gastrointestinal, ocorre a migração da bactéria pela corrente sanguínea até o fígado e a consequente multiplicação nas células fagocitárias (células de Kupffer) deste órgão. A menos que funcione uma resposta imunológica eficiente por parte do hospedeiro, a bactéria continua a se multiplicar. A partir desta etapa, a bactéria retornará para a corrente sanguínea, podendo causar infecções sistêmicas ou do SNC, potencialmente fatais (FREITAG et al., 2009).

1.3.3. Fatores de Virulência

Para aderir e invadir as células do hospedeiro, esta bactéria utiliza várias proteínas conhecidas como invasinas ou internalinas (InlA e InlB), que interagem com receptores celulares de membrana e permitem a internalização da bactéria na célula-hospedeira. A InlA se liga a uma E-caderina, uma molécula de adesão da célula-hospedeira, enquanto a InlB se liga a um receptor de fator de crescimento do hepatócito (HGF), denominado Met; a ligação a estes receptores permite que a bactéria consiga entrar nas células-hospedeiras através da endocitose (FREITAG et al., 2009).

Sabe-se que após a entrada na célula do hospedeiro, o patógeno escapa do ambiente hostil do fagossoma pela secreção de listeriolisina O (LLO), uma hemolisina codificada pelo gene *hly*. Esta hemolisina atua reconhecendo o colesterol da membrana, formando poros e favorecendo a lise da parede do fagossoma, provocando a migração da bactéria para o citoplasma da célula invadida (LÓPEZ et al., 2006). Outro fator de virulência que atua sinergicamente com a listeriolisina é constituído por duas fosfolipases (PlcA e PlcB) que auxiliam a listeriolisina no rompimento do vacúolo primário e secundário. PlcA (*plcA*) é secretada na forma ativa enquanto PlcB (*plcB*) necessita ser clivada por uma metaloprotease (*mpl*) para ser ativada (KATHARIOU, 2002). ActA (*actA*) é uma proteína essencial para a mobilidade intracelular, sendo responsável pela formação da estrutura de actina que movimenta a bactéria no citoplasma favorecendo a invasão das células vizinhas (LIU et al., 2007). Estes cinco genes (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*) estão localizados em um locus de 9kb denominado de região central de virulência, também referida como LIPI-1 (Ilha de patogenicidade de *Listeria* 1). O gene *hly* está rodeado por dois *operons* associados à virulência, o *operon* de lecitinase, que contém os genes *mpl*, *actA* e *plcB*, e, no outro extremo, o *operon* *plcA-prfA*, que é transcrito na orientação oposta (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

A maioria dos fatores de virulência de *L. monocytogenes* é regulada pelo Fator Regulador Positivo (PrfA), codificado pelo gene *prfA*, também localizado no locus de 9Kb citado anteriormente. PrfA é o regulador central de virulência de *L. monocytogenes* e ativa a expressão dos genes de LIPI-1 e de alguns outros genes de virulência, incluindo membros da família das internalinas (*inlA* e *inlB*) que estão localizadas fora de LIPI-1 (PORTNOY et al., 1992).

Enquanto a função de PrfA como ativador dos genes de virulência de *L. monocytogenes* já está bem estabelecida, evidências indicam que um fator sigma, o σ^B , codificado pelo gene

sigB, também contribui para transcrição de alguns genes de virulência desse micro-organismo (OLLINGER et al., 2009). Além disso, estudos têm demonstrado sua função na regulação da expressão de pelo menos 140 genes relacionados à produção de proteínas de importância na resposta ao estresse, regulação da transcrição, metabolismo de carboidratos e transporte (RAENGPRADUB et al., 2008).

O genoma de *L. monocytogenes* apresenta cinco genes que codificam diferentes fatores sigma, embora algumas linhagens apresentem apenas quatro deles (ZHANG et al., 2003). O fator Sigma A (σ^a) faz parte da principal subunidade da enzima RNA polimerase de *L. monocytogenes*, também conhecido como RpoD e codificada por *rpoD*. O fator sigma 54 (σ^{54}), codificado por *sigL*, foi identificado pela primeira vez em cepas mutantes de *L. monocytogenes* que apresentavam resistência a bacteriocinas. Arous et al. (2004) identificaram através de estudos de transcriptoma e proteômica, 77 genes sob o controle de σ^{54} , muitos deles relacionados ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos. Adicionalmente, dois estudos sugeriram que σ^{54} também desempenharia um papel na tolerância osmótica em *L. monocytogenes* (OKADA et al., 2006; LIU et al., 2002). O gene *sigH* codifica o fator Sigma H (σ^h), que está diretamente envolvido na resposta a mudanças de pH ambientais (REA et al., 2004). Já *sigC* codifica Sigma C (σ^c), uma proteína que pertence à família dos fatores com função extracitoplasmática (ECF) (ZHANG et al., 2005). O gene *sigC* está presente apenas em cepas de *L. monocytogenes* da linhagem II (ZHANG et al., 2003). Finalmente, o já citado fator Sigma B (σ^b), codificado por *sigB*, foi o primeiro a ser identificado baseado em sua homologia com *sigB* de *Bacillus subtilis*. Os primeiros relatos apontaram o envolvimento de Sigma B tanto na tolerância ácida (WIEDMANN et al., 1998) quanto na osmorregulação (BECKER et al., 1998).

Segundo hipóteses levantadas por Garner et al. (2006), o fator σ^B desempenha um papel crucial tanto na capacidade de invasão de *L. monocytogenes* em células epiteliais humanas quanto durante o estagio gastrointestinal da listeriose em cobaias. Eles verificaram que cepas mutantes $\Delta sigB$ apresentavam menor capacidade de invasão e também menor patogenicidade, confirmando assim, que este fator conhecidamente atuante na resposta às diferentes condições de estresse ambientais, contribui também para a patogenicidade de *L. monocytogenes*.

Alguns estudos sobre o comportamento e a expressão de genes de virulência de *L. monocytogenes* têm sido realizados, tanto com a finalidade de verificar se há alteração no padrão de expressão gênica quando estas são submetidas a diferentes condições de multiplicação, como também para tentar elucidar as diferenças de comportamento entre os sorotipos 1/2a e 4b, sem, entretanto, correlacioná-las ao fator σ^B .

No estudo realizado por Werbrouck et al. (2007), foram analisados vários fatores que poderiam influenciar na expressão dos genes *ami* (adesão a autolisinas), *clpC* (proteína de choque), *hlyA* (listeriolisina), *opuCB* (transporte de carnitina), *tufA* (fator de alongação) e *inlB* (internalina B) em *L. monocytogenes*. Os autores concluíram que houve diferença nos níveis de expressão dos genes entre as diversas fases de multiplicação das bactérias em meio de cultivo e entre os diferentes sorotipos analisados (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3b e 4b).

Hanna e Wang (2006) avaliaram o efeito da temperatura (4°C, 25°C, 37°C) e de diferentes ácidos encontrados nos alimentos e no estômago do hospedeiro, na expressão do gene da internalina (*inlA*) em cepa Scott A. Avaliando apenas o efeito da temperatura em pH 6,5, sem a adição de ácido, observaram a maior expressão do gene a 37°C. Porém, com a adição de ácidos (pH 5,0), os autores observaram a mais alta e a mais baixa expressão a 25°C, sendo a maior expressão na presença do ácido clorídrico e as menores, sem diferença significativa entre elas, na presença dos ácidos láctico e acético. Estes pesquisadores concluíram que a expressão de *inlA* é dependente da temperatura e do tipo de ácido presente, e levantaram ainda a possibilidade de haver o envolvimento de outros fatores.

Nos estudos citados anteriormente, a expressão dos genes de virulência foi verificada em meios de cultivo, entretanto é sabido que após a internalização da bactéria pela célula do hospedeiro, outros fatores podem influenciar esses genes de virulência.

A proteína InlA, conforme citado anteriormente, é uma proteína localizada na parede celular da bactéria e tem papel crucial na virulência de *L. monocytogenes*, em particular, no mecanismo de invasão em células epiteliais humanas (LECUIT et al., 1997). Mutações ocorridas ao longo do tempo ocasionaram o surgimento de códons de parada prematura (*premature stop codons* - PMSCs) em *inlA*, em cepas de *L. monocytogenes* isoladas em múltiplos países, tais como EUA (ORSI et al., 2007), França (ROUSSEAUX et al., 2004), Portugal (FELICIO et al., 2007) e Japão (HANDA-MIYA et al., 2007). A ocorrência de PMSCs no gene *inlA* resulta na secreção de InlA de uma forma truncada, provavelmente interferindo no mecanismo de ação dessa proteína (JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005b).

Alguns estudos tanto na França quanto nos EUA demonstraram que cepas de *L. monocytogenes* que possuíam PMSCs em *inlA*, constituíam uma proporção significativa (>30%) dos isolados de alimentos, mas raramente eram isolados a partir de amostras clínicas (JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005a). Da mesma forma, cepas de *L. monocytogenes* que apresentavam essas mutações também tiveram sua capacidade de invasão reduzida em células epiteliais humanas da linhagem Caco-2 (ORSI et al.,

2007; ROUSSEAU et al., 2004). Apesar de os PMSCs em *inlA* serem encontrados em isolados de *L. monocytogenes* representantes das linhagens (I e II), eles são mais comumente detectados em isolados da linhagem II, sorotipo 1/2a e 1/2c (JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2005a), fornecendo uma possível explicação para a menor prevalência de isolados da linhagem II em casos clínicos.

Os avanços na biologia molecular têm ajudado muito na elucidação dos mecanismos de ação de *L. monocytogenes* e nas diferenças de prevalência de um sorotipo em relação a outro, seja em casos clínicos, alimentos ou ambientes. A técnica de PCR tem sido também utilizada para avaliar a expressão de genes específicos, empregando-se a PCR Transcriptase Reversa (RT-PCR) (BUSTIN, 2000). A RT-PCR tem início com a produção de um DNA complementar (cDNA) a partir de uma molécula de RNA mensageiro (mRNA) fita-simples, pela ação de uma DNA polimerase RNA-dependente (transcriptase reversa). Depois de completada a reação de transcrição reversa e do cDNA ter sido gerado, uma reação de PCR é iniciada, gerando inúmeras cópias deste cDNA. RT-PCR é um método sensível e flexível e pode ser utilizado para caracterizar os padrões de expressão do mRNA (BUSTIN, 2000).

Apesar da RT-PCR ser uma técnica muito sensível para a detecção e quantificação do mRNA, apresenta como limitação do seu uso a qualidade do mRNA, pois este é extremamente sensível (BUSTIN et al., 2004). Uma opção para minimizar esta limitação da técnica é a utilização da RT-PCR em tempo real, na qual se utiliza sondas fluorescentes específicas que possibilitam a detecção e a quantificação do mRNA no decorrer da reação. Esta associação de técnicas tem vantagens com relação à sensibilidade, à velocidade de obtenção dos resultados, à alta taxa de transferência dos mesmos, além do alto grau de automação quando comparado com métodos de quantificação convencionais como, por exemplo, o *Northern blot* (WERBROUCK et al., 2007).

A tecnologia de *microarray*, ou microarranjos de DNA, é outra ferramenta bastante útil, pois possibilita a avaliação simultânea da expressão de milhares de genes, quer seja de espécies animais, vegetais ou de micro-organismos em diferentes estágios de desenvolvimento ou condições ambientais. Devido seu caráter prospectivo, essa tecnologia tem sido amplamente utilizada em experimentos de genômica funcional, projetados para estudar as funções e as interações dos genes dentro do contexto global do genoma (ROSA, 2007).

A base genética da patogenicidade de *L. monocytogenes* tem sido avaliada por estudos de genômica comparativa (DOUMITH et al., 2004) e transcriptomas (SEVERINO et al., 2007), utilizando-se diferentes técnicas moleculares, tais como, PCR tempo real e *macroarray*. Entretanto,

devido à busca por uma redução de custos e maior agilidade e precisão nas análises, os microarranjos de DNA têm sido utilizados e desenvolvidos para várias cepas de *L. monocytogenes*.

Esses chips para *Listeria* também têm sido utilizados para a análise da expressão gênica global *in vitro* do fator PrfA (MILOHANIC et al., 2003), e também para outros importantes reguladores transcricionais de virulência (Sigma B, Sigma 54, HrcA, CtsR, VirR) (KAZMIERCZAK et al., 2003; HAIN et al., 2008; HU et al., 2007a, HU et al., 2007b; MANDIN et al., 2005). Essa abordagem já foi aplicada também para a determinação do perfil de expressão gênica intracelular de *L. monocytogenes* em linhagens de células epiteliais e macrófagos (CHATTERJEE et al., 2006; JOSEPH et al., 2006).

1.4 Surto e casos clínicos de listeriose

Listeria monocytogenes teve seu reconhecimento como importante patógeno humano na década de 1980, depois de surtos de listeriose ocorridos na América do Norte e na Europa terem sido epidemiologicamente considerados de origem alimentar (FARBER e PETERKIN, 1991). Após estes surtos, que apresentaram alta letalidade, as indústrias processadoras de alimentos foram alertadas para a importância da ocorrência deste micro-organismo em seus produtos.

Listeria spp. tem distribuição mundial, mas a doença em humanos é mais frequentemente relatada em países desenvolvidos. Isto pode ser justificado não só pela existência de redes de vigilância mais eficazes nestes países, como também pela mudança dos hábitos alimentares nas sociedades industrializadas, onde há cada vez mais procura por alimentos prontos para o consumo, apontados como um dos principais responsáveis por casos/surtos de doença (MCLAUCHLIN, 1996).

A implementação de redes de vigilância tem tido um papel importante na detecção precoce de surtos de listeriose, bem como no seu controle e determinação das fontes de infecção (GOLDFINE e SHEN, 2007). Um exemplo disso é o Chile, único país em desenvolvimento onde surto de listeriose de origem alimentar já foi relatado.

Casos de listeriose são frequentes e vêm sendo relatados há pelo menos três décadas. Na Europa, a taxa de detecção anual é de aproximadamente 0,3 – 7,5 casos por 100.000 habitantes da população em geral, e 12 casos a cada 100.000 mulheres grávidas (WHO, 2012).

Dados do último relatório da *European Food Safety Authority* (LAHUERTA et al., 2011), referente ao ano de 2009, demonstram que depois de dois anos de diminuição no número de casos de listeriose, a taxa de notificação de casos confirmados (com base em países que forneceram dados durante cinco anos consecutivos) havia aumentado novamente. Houve um incremento de 19,1% de casos humanos de listeriose, em relação a 2008, continuando a haver uma elevada taxa de fatalidade (16,6%), mais evidente em adultos com mais de 45 anos.

Já nos EUA, de acordo com Scallan et al. (2011), estima-se que ocorram aproximadamente 48 milhões casos anuais de Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA), resultando em 3.000 mortes e 128.000 hospitalizações. Neste contexto, a listeriose responde por 1.590 casos/ano, resultando em 1.455 (91,5%) hospitalizações e 255 (16%) mortes, ou seja, tornando-a uma das bactérias com maior poder letal.

A sub-notificação é um dos grandes problemas nos estudos epidemiológicos das doenças clínicas e de origem alimentar. No Brasil, poucos estudos clínicos têm sido realizados nos últimos anos, tornando escassos os dados epidemiológicos deste micro-organismo no país. Hofer et al. (1998), em um estudo realizado em três pacientes com listeriose no Distrito Federal, conseguiram isolar *L. monocytogenes*, sorotipo 4b e sorotipo 1/2a, em todos os pacientes que apresentavam meningite. Em outro estudo conduzido no país, Landgraf et al. (1999) isolaram em um mesmo centro obstétrico de um hospital da Grande São Paulo, *L. monocytogenes* a partir do líquido cefalorraquidiano de cinco crianças, sendo que todas as amostras pertenceram ao mesmo sorotipo, 4b. Nesses estudos os pacientes eram crianças, recém-nascidos e uma mulher portadora de lúpus eritematoso sistêmico.

Estes trabalhos demonstraram que, apesar de não haver registros oficiais de casos de listeriose, a ameaça de *L. monocytogenes* para a saúde pública no Brasil é tão grave quanto em outros países. Este fato pode ser comprovado com o estudo realizado por Reis et al. (2011), que conseguiram agrupar 68 isolados clínicos de *L. monocytogenes*, durante os anos de 1970 e 2008, e também verificar a alta incidência do sorotipo 4b (60,3%) e 1/2a (20,6%) nessas amostras.

1.5 Alimentos implicados em surtos e casos de listeriose

L. monocytogenes pode estar presente não só em alimentos e ingredientes crus, como também em alimentos submetidos a tratamentos térmicos como resultado de contaminações

cruzadas pós-processamento. Esse risco é provavelmente maior em alimentos prontos para o consumo (“read-to-eat”- RTE), pois os mesmos apresentam vida de prateleira mais longa possibilitando a multiplicação de *L. monocytogenes*.

Como acontece na notificação de casos humanos de listeriose, as mesmas dificuldades são sentidas em nosso país relativamente à ocorrência da bactéria em produtos alimentícios. A inexistência de bases de dados centralizados com os resultados das análises de alimentos dificulta a percepção da real dimensão deste problema

Diversos surtos de origem alimentar, resultando em listeriose invasiva, têm sido documentados como causados por diferentes veículos, tais como leite, queijos macios, manteiga, peixes defumados, produtos RTE a base de carne, salsichas, produtos à base de carne de peru, entre outros. Dentre esses alimentos relatados, aproximadamente 32% dos casos/surtos podem ser atribuídos a queijos ou produtos embutidos (GOLDFINE e SHEN, 2007).

O *Food and Drug Administration* (FDA) americano elaborou, a partir de uma avaliação de risco microbiológica, uma escala na qual diversos tipos de alimentos foram distribuídos por cinco grupos de risco (Tabela 1). A inserção de cada alimento nos diferentes grupos leva em conta o risco calculado para cada porção ingerida ou ainda com relação à ingestão anual; as taxas de contaminação do alimento; a possibilidade de multiplicação de *L. monocytogenes* no alimento sob refrigeração; o tempo de armazenamento e a frequência de consumo (FDA, 2003).

Esta indicação do risco determina o tipo de atenção que é necessário despender com cada grupo de alimentos com relação à diminuição da incidência de listeriose, conduzindo ao desenvolvimento de novas estratégias de controle e/ou programas de educação do consumidor adequados para esses produtos.

Tabela 1. Distribuição de alimentos em categorias por grupos de risco de veiculação de listeriose (FDA, 2003).

Indicação de Risco	Alimentos incluídos
Muito elevado	Produtos embutidos; salsichas não aquecidas
Elevado	Produtos lácteos com elevado teor de gordura e outros produtos lácteos; patê e pastas de carne; queijos macios não curados; pescado defumado e leite não pasteurizado
Moderado	Crustáceos cozidos; saladas; salame e mortadela; salsicha aquecida; queijo fresco; queijo semi-mole; queijo curado; vegetais e frutas
Baixo	Peixe em conserva e marisco cru
Muito Baixo	Produtos lácteos fermentados; queijo de massa dura; sorvetes e produtos lácteos congelados; queijo fundido

Os dois fatores mais importantes na epidemiologia dos surtos de listeriose, assim como de outras ETA, são a suscetibilidade do hospedeiro e a virulência do micro-organismo (FARBER e PETERKIN, 1991). As condições de saúde do hospedeiro fogem ao controle da indústria alimentícia, portanto, esta deve se preocupar com a qualidade e inocuidade do produto oferecido ao consumidor estando atenta às condições higiênicas do ambiente industrial, à matéria-prima utilizada e à rigorosa aderência às boas práticas de fabricação (BFP). Métodos analíticos eficientes têm sido desenvolvidos e oferecidos ao mercado a medida que descobertas científicas têm sido divulgadas, porém algumas dúvidas ainda existem no mundo científico com relação à virulência das diferentes cepas de *L. monocytogenes* (KATHARIOU, 2002).

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Poucos estudos avaliaram a influência das condições de estresse encontradas pelos micro-organismos durante a produção/processamento de alimentos com *aw* reduzida, no comportamento e na expressão gênica de *Listeria monocytogenes*. A compreensão detalhada da expressão gênica global das duas principais linhagens (I e II) de *L. monocytogenes*, quando submetidas a diferentes parâmetros de multiplicação, é de fundamental importância para que a indústria de alimentos possa desenvolver estratégias de intervenção e controle deste micro-organismo ao longo da cadeia de produção e armazenamento.

Além da avaliação gênica global, o papel dos fatores Sigma B e PrfA têm sido investigados com cepas em fase estacionária, sob condições ambientais brandas (por exemplo, valores de pH próximos a neutralidade e *aw* elevada), mas as interações desses reguladores não foram investigadas sob condições de estresse tais como temperatura elevada e *aw* reduzida. Além disso, o efeito do estresse osmótico sobre a expressão do gene *sigB* foi medido para genes específicos, mas não avaliado em uma escala global. A caracterização das interações entre a resposta ao estresse e a virulência, bem como a compreensão sobre o comportamento global do transcriptoma em resposta ao estresse osmótico, podem fornecer informações valiosas sobre como *L. monocytogenes* sobrevive e se adapta a condições adversas, levando ao desenvolvimento de novos produtos e metodologias para intervenção e controle.

Estudos recentes têm investigado o genoma de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de amostras clínicas e alimentos, a fim de encontrar evidências para a elevada prevalência da linhagem I em casos clínicos e da linhagem II em amostras de alimentos. Entretanto, estes estudos apontam diferenças com relação ao conteúdo gênico, mas não com relação ao perfil de expressão gênica de cada uma quando submetidas às condições encontradas no processamento de alimentos. Assim, é de fundamental importância a determinação do perfil de expressão com o intuito de explicar, em conjunto com outros dados da literatura, as razões para o sucesso das duas principais linhagens de *L. monocytogenes* nos alimentos e nos casos de listeriose humana.

Com isso, os objetivos deste estudo foram:

- Verificar o comportamento de cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipo 4b (linhagem I) e 1/2a (linhagem II), de origem clínica e de alimentos, frente a fatores de estresse (a_w e temperatura) encontrados na produção de alimentos;
- Avaliar o papel dos fatores de transcrição σ^B e PrfA, em cepas das linhagens I e II de *Listeria monocytogenes*, quando submetidas a estresse osmótico e temperatura ambiente (25°C);
- Traçar o perfil de expressão gênica global, avaliando o papel do fator de transcrição σ^B , em cepas de *Listeria monocytogenes* sorotipo 1/2b (linhagem I) e 1/2a (linhagem II), sob condições de estresse osmótico e temperatura ambiente (25°C);
- Caracterizar os isolados de *Listeria monocytogenes* sorotipo 4b e 1/2a, de origem clínica e de alimentos, quanto ao seu potencial de hemólise e capacidade invasiva em células epiteliais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas de *Listeria monocytogenes*

Vinte e duas cepas de *Listeria monocytogenes* foram utilizadas neste estudo, sendo 12 isoladas de casos clínicos (seis cepas sorotipo 4b e seis sorotipo 1/2a) e 10 isoladas de alimentos (seis sorotipo 4b e quatro sorotipo 1/2a). Estas cepas foram reunidas a partir do acervo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (FCF/USP/SP), do Instituto Adolfo Lutz (Campinas/SP) e do acervo do Laboratório de Zoonoses Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ). Adicionalmente, foram utilizadas duas cepas como controles - *L. monocytogenes* Scott A, sorotipo 4b de origem clínica, amplamente utilizada em estudos comportamentais/virulência e uma cepa de *Listeria innocua*, isolada a partir de amostras ambientais e utilizada como controle externo, com intuito de verificar o comportamento de outra espécie do gênero *Listeria* em condições de estresse osmótico em diferentes temperaturas. A Tabela 2 apresenta as principais características das cepas de *L. monocytogenes* selecionadas e utilizadas no estudo.

Com o intuito de avaliar a influência dos principais fatores de transcrição envolvidos na resposta ao estresse (Sigma B - σ^B) e na virulência (PrfA) de *L. monocytogenes*, foram selecionadas as cepas J1-194 – *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b (linhagem I) e a cepa X1-001 – *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a (linhagem II), juntamente com suas respectivas mutantes isogênicas ($\Delta sigB$, $\Delta prfA$ e $\Delta sigB\Delta prfA$) (Tabela 3), uma vez que as mesmas já foram utilizadas em outros estudos comportamentais e de genômica funcional (OLLINGER et al., 2009; OLIVER et al., 2010; BERGHOLZ et al., 2010).

Todas as cepas foram mantidas e estocadas a -70°C, em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) acrescido de glicerol (20% - volume/volume) até o momento de serem utilizadas.

Tabela 2. Identificação das cepas de *L. monocytogenes* utilizadas no projeto de pesquisa

Espécie	Sorotipo	Ano isolamento	Origem	Referência	Amostra
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	2003	Carcaça Refrigerada de Nelore	Chiarini (2007)	9a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	2003	Peça de carne	Chiarini (2007)	10a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	2004	Corte de Frango Congelado	Chiarini (2007)	11a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	2007	Carcaça de Frango	Dias (2008)	12a
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2004	Frango pós <i>Chiller</i>	Chiarini (2007)	1b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2004	Frango pós <i>Chiller</i>	Chiarini (2007)	2b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2004	Corte de Frango Resfriado	Chiarini (2007)	3b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2004	Corte de Frango Congelado	Chiarini (2007)	4b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2007	Carcaça de Frango	Dias (2008)	6b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2007	Carcaça de Frango	Dias (2008)	7b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2001	Sangue (adulto)	Cruz (2007)	8b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2001	Sangue (adulto)	Marques et al. (2007)	12b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2001	Líquido de peritórax de aorta	Marques et al. (2007)	14b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	1989	Sangue (adulto)	Hofer et al. (2006)	16b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	1993	Sangue (recém-nascido)	Hofer et al. (2006)	17b
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2001	Líquido cefalorraquidiano (óbito)	Marques et al. (2007)	18b
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	2001	Líquido cefalorraquidiano	Marques et al. (2007)	13a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	1998	Líquido cefalorraquidiano	Hofer et al. (2006)	15a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	1984	Sangue (adulto)	Hofer et al. (2006)	19a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	1985	Sangue (adulto)	Hofer et al. (2006)	20a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	1983	Líquido cefalorraquidiano	Hofer et al. (2006)	21a
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a	1985	Sangue (adulto)	Hofer et al. (2006)	22a
<i>L.innocua</i>	ND	2007	Ambiente	Cruz (2007)	LI
<i>L.monocytogenes</i>	4b	2001	Taquipinéria	Hofer et al. (2006)	Scott A

*Não determinada

** Cinza - cepas de alimentos, Azul – cepas clínicas, Laranja – cepas controle.

Tabela 3. Cepas selvagens e mutantes de *L. monocytogenes* utilizadas para alguns dos ensaios fenotípicos e genotípicos

Amostra (ID)	Sorotipo	Origem	Genótipo	Referência
<u><i>Linhagem I</i></u>				
J1-194	1/2b	Origem Clínica	Selvagem	Sauders et al. (2003)
C6-001	1/2b	A partir de J1-194	$\Delta sigB$	Oliver et al. (2010)
C6-004	1/2b	A partir de J1-194	$\Delta prfA$	-*
C6-005	1/2b	A partir de J1-194	$\Delta sigB \Delta prfA$	-*
<u><i>Linhagem II</i></u>				
X1-001	1/2a	Origem Clínica	Selvagem	Bishop e Hinrichs (1987)
A1-254	1/2a	A partir de X1-001	$\Delta sigB$	Wiedmann et al. (1998)
B2-046	1/2a	A partir de X1-001	$\Delta prfA$	McGann et al. (2007)
B2-068	1/2a	A partir de X1-001	$\Delta sigB \Delta prfA$	McGann et al. (2007)

*cepas mutantes construídas pelo *Food Safety Lab* (Cornell University, USA), mas não publicadas até o momento

3.2 Avaliação da similaridade genética de *L. monocytogenes* por *MultiLocus Sequence Typing* (MLST)

Os experimentos de MLST foram realizados com os *primers* e condições de PCR descritos por Ragon et al. (2008). As 22 cepas de *L. monocytogenes*, mais as cepas Scott A (Tabela 2), J1-194 e X1-001 (Tabela 3), foram selecionadas para o ensaio de genotipagem com intuito de avaliar o grau de proximidade genética entre as cepas e também para assegurar que os estudos subsequentes não seriam realizados com clones de cepas.

O DNA total das cepas selecionadas foi extraído de 1ml de caldo infusão cérebro coração (BHI), a partir de culturas 24h de cada cepa, empregando o *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, foi realizada a quantificação e avaliação do grau de pureza do DNA, através de espectrofotometria, com auxílio do equipamento NanoDrop 2000c (Thermo, USA)

Os genes *housekeeping* selecionados para as reações de amplificação por PCR e posteriormente sequenciamento foram: transportador ABC (*abcZ*), aminotransferase (*dat*), l-lactato desidrogenase (*ldh*), catalase (*cat*), succinil diaminopimetalo desuccinilase (*dapE*), beta-glucosidase (*bglA*) e histidinaquinase (*lhkA*). As sequências de primers e tamanho dos *amplicons* gerados por PCR estão apresentados na Tabela 4.

As reações de PCR foram realizadas, individualmente para cada gene, em volume total de 25 µl contendo 100ng do DNA molde; tampão de PCR 10X [Tris-HCl (pH 8.4), 50mM KCl] (Fermentas, USA); 1,5mM de MgCl₂ (Fermentas, USA); 200µM de cada dNTP (Fermentas); 10pmol de cada *primer* e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As amplificações foram conduzidas no equipamento *Mastercycler Ep Gradient* (Eppendorf, USA) com os seguintes parâmetros: desnaturação inicial do DNA a 94°C por 2 minutos; 30 ciclos de 94°C por 30 segundos (separação das fitas de DNA), 52°C por 30 segundos (pareamento de primers) e 72°C por 1 minuto (extensão do DNA); e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1%, preparados com tampão 0,5x TRIS-Borato-EDTA (TBE). O marcador de peso molecular 100bp (New England Biolabs, UK) foi utilizado nas eletroforeses.

Tabela 4. Sequências e tamanho dos *amplicons* dos *primers* utilizados na amplificação dos genes *housekeeping* de *L. monocytogenes* para a técnica de MLST

Gene	Sequência dos primers (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>abcZ</i>	F*: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATCGCTGCTGCCACTTTTATCCA R*: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTCAAGGTCGCGTTTAGAG	537
<i>bglA</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCCGACTTTTTATGGGGTGGAG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGATTAAATACGGTGCGGACATA	399
<i>cat</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATTGGCGCATTTTGATAGAGA R: TTGTGACGGATAACAATTTTCAGATTGACGATTCCTGCTTTTG	486
<i>dapE</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACGACTATTGGGATGAAGAACAAG R: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATCGAACTATGGGCATTTTACC	462
<i>dat</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAAAGAGAAGATGCCACAGTTGA R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGCGTCCATAATACACCATCTTT	471
<i>ldh</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGTATGATTGACATAGATAAAGA R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTATAAATGTCGTTTCATACCAT	453
<i>lhkA</i>	F: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAGAATGCCAACGACGAAACC R: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGGGAAACATCGAATAAAC	480

*F: forward, R: reverse

Após as reações de amplificação e verificação dos *amplicons* gerados, os produtos de PCR foram purificados com auxílio do kit *DNA GFX DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare, USA), segundo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento das amostras foi realizado pelos técnicos do Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociência – USP/SP), em sequenciador automático *ABI 3730 DNA Analyser* (Applied Biosystems, USA) com auxílio do kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems). Todas as amostras, para todos os genes *housekeeping*, foram sequenciadas com os *primers* *SEQF* (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTGT-3') e *SEQR* (5'-TTGTGAGCGGATAACAATTTCT-3') (RAGON et al., 2008).

Após a análise visual da qualidade das sequências, estas foram alinhadas com as sequências para os mesmos genes *housekeeping* disponíveis no banco de dados *Listeria* MLST (www.pasteur.fr/mlst), com intuito de delimitar o tamanho (pb) dos fragmentos gerados e, assim, minimizar a perda da qualidade das mesmas, uma vez que na maioria dos casos se obtém sequências de má qualidade nas extremidades das amostras.

A avaliação da similaridade genética entre as cepas foi realizada com a construção de uma árvore filogenética, a partir das sequências dos sete genes das 25 amostras de *L. monocytogenes* avaliadas. As sequências referentes aos *housekeeping* foram concatenadas, simulando uma sequência única, de acordo com a seguinte ordem: *abcZ*, *dat*, *ldh*, *cat*, *dapE*,

bglA e *lhkA*. A partir do alinhamento das sequências concatenadas, a árvore foi construída com auxílio dos métodos de *maximum likelihood* e *bootstrap*, no software MEGA v.5 (TAMURA et al., 2011).

3.3 Avaliação do efeito do estresse osmótico na multiplicação de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas

Três valores de atividade de água (*aw*) - 0,88; 0,91 e 0,94 - foram selecionados para avaliar, inicialmente, o comportamento de quatro cepas quanto à resistência e sobrevivência ao estresse osmótico em diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 25°C). As quatro cepas (2b, 14b, 9a, 21a - Tabela 2) foram aleatoriamente selecionadas de modo a se avaliar duas representantes de cada sorotipo, além da cepa de referência (Scott A), escolhida como controle para o estudo.

As diferentes atividades de água selecionadas para teste foram obtidas através da adição do umectante cloreto de sódio (peso/volume) ao caldo BHI, nas seguintes proporções: *aw* 0,88 – 20%; 0,91 – 15% e 0,94 – 11%, segundo Chirife et al. (1984). O valor das mesmas foi confirmado com auxílio do equipamento Aw-Center (Novasina, Suíça). Depois de esterilizados, os meios de cultura foram distribuídos em volume igual a 99 ml, para cada cepa, em frascos do tipo Erlenmeyer com capacidade total de 250 ml, sendo a seguir mantidos em refrigeração até o momento de inoculação das cepas.

As cinco cepas foram retiradas do estoque a -70°C, semeadas em ágar BHI e incubadas a 37°C por 48 horas. Uma colônia de cada cepa foi transferida para caldo BHI, sendo novamente incubada a 37°C por 24 horas. A partir do tubo de BHI, as concentrações das cinco cepas foram ajustadas através de diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% (peso/volume), com auxílio da escala de Macfarland, até que se obtivesse uma população inicial de *L. monocytogenes* da ordem de 10⁶ UFC/ml de caldo. Após esse ajuste inicial, 1ml de cada cultivo foi adicionado a 99 ml de caldo BHI, previamente ajustado para as três diferentes *aw* selecionadas (diluição 1:100), obtendo-se um inóculo de aproximadamente 10⁴ UFC/ml. Os cultivos foram incubados a 4°C, 10°C e 25°C, durante o período total de 40, 40 e 10 dias, respectivamente. Em intervalos de tempo variáveis, alíquotas foram retiradas, diluídas serialmente e semeadas em ágar BHI (em duplicatas), para enumeração de colônias e consequente determinação da variação populacional (UFC/ml de caldo) ao longo do tempo.

Todas as curvas de multiplicação foram realizadas em triplicatas biológicas, ou seja, cada curva de multiplicação, para cada cepa, foi repetida em três diferentes oportunidades, sendo que para a análise dos resultados, a população média de *L. monocytogenes* observada nas placas, para cada condição estudada e em cada tempo de análise, foi calculada e convertida para escala logarítmica para a construção dos gráficos.

3.4 Avaliação comportamental de *L. monocytogenes* cultivada em ambiente com elevado estresse osmótico e em diferentes temperaturas

A a_w selecionada para os experimentos fenotípicos e genotípicos foi obtida após a definição da pior condição de estresse osmótico em que as cepas testadas em 3.3 apresentaram tendências à multiplicação exponencial ou simplesmente não sofreram decréscimo populacional. Esta condição foi obtida com a_w 0,94 (adição de 11% de cloreto de sódio) ao caldo de cultura BHI, conforme descrito em 3.3.

As 22 cepas de *L. monocytogenes* (mais as cepas controles) foram semeadas em ágar BHI, sendo em seguida incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada cepa foi transferida para 5mL de caldo BHI e novamente incubada a 37°C, com agitação de 230 rpm, por 12-16 horas. Uma alíquota equivalente a 1% (volume/volume) de cada cultura bacteriana foi transferida para outro tubo contendo 5mL de caldo BHI pré-aquecido (37°C) e incubada até atingir a densidade óptica de 0,4 no comprimento de onda 600nm (DO_{600}). Novamente, 1% (volume/volume) de cada cultura foi inoculado em outro tubo contendo 5mL de caldo BHI pré-aquecido (37°C) e incubado da mesma forma até atingir a DO_{600} de 1,0 (o volume transferido foi ajustado baseado na DO_{600} da cultura inicial). Depois de finalizada a segunda etapa, as culturas atingiram de forma homogênea o início da fase estacionária, definida como a multiplicação até a DO_{600} 1,0, seguida de uma incubação adicional de 3 horas (OLIVER et al., 2010).

A partir dos cultivos em fase estacionária, as concentrações das cepas foram ajustadas através de diluições seriadas em solução salina 0,85% (p/v), até que se obtivesse uma população inicial de *L. monocytogenes* da ordem de 10^6 UFC/mL de caldo. A seguir, 1mL de cada cultivo foi adicionado a três frascos contendo 99mL de caldo BHI, ajustado para a a_w 0,94 (diluição 1:100), obtendo-se um inóculo inicial de aproximadamente 10^4 UFC/mL. Cada um dos três cultivos de cada cepa foi incubado a 4°C, 10°C e 25°C, durante o período total de 73, 42 e 15 dias, respectivamente. Em intervalos de tempo variáveis, alíquotas foram

retiradas e, após diluições decimais seriadas, foram semeadas em duplicata, em ágar padrão para contagem (PCA) para enumeração de colônias e determinação da variação populacional (UFC/mL de caldo) ao longo do tempo.

A população média de *L. monocytogenes* observada nas placas, para cada condição estudada e em cada tempo de análise, foi calculada e convertida para escala logarítmica para a construção dos gráficos. Esse experimento foi conduzido em triplicata biológica e os dados gerados foram utilizados para os cálculos dos parâmetros de multiplicação (concentração inicial, taxa de multiplicação, duração da fase lag e concentração final máxima).

Os parâmetros de multiplicação para cada isolado foram estimados pelo modelo de Baranyi (BARANYI e ROBERTS, 1994) implementado no pacote NLStools (v.0.0-4) do *software* R (v.2.5.1). Os valores de UFC/mL para cada isolado, em cada ponto de amostragem, foram transformados em escala logarítmica e utilizados para estimar a duração da fase lag, taxa de multiplicação específica máxima e população final. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar se os valores apresentavam distribuição normal. Quando os dados apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste *t-Student*, e aqueles que não apresentaram distribuição normal foram avaliados quanto a presença de diferenças significativas entre os sorotipos e origens pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.5 Avaliação da multiplicação das cepas *L. monocytogenes* 1/2a e 1/2b e suas respectivas mutantes isogênicas ($\Delta sigB$, $\Delta prfA$ e $\Delta sigB\Delta prfA$), sob estresse osmótico a 25°C

Com intuito de avaliar o papel dos fatores de transcrição, envolvidos na resposta ao estresse e virulência, durante situações semelhantes às aquelas que os micro-organismos podem enfrentar na indústria de alimentos, as oito cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b e 1/2a (Tabela 3) foram cultivadas a partir das culturas em fase estacionária em caldo BHI (a_w 0,94) a 25°C, conforme descrito em 3.3 e 3.4, durante aproximadamente 20 dias.

Os parâmetros de multiplicação para cada isolado foram estimados pelo modelo de Baranyi conforme 3.4. A comparação estatística do comportamento da cepa selvagem, e de cada um dos seus mutantes isogênicos, foi realizada com auxílio do teste *t-Student* (teste paramétrico) para os parâmetros de duração de fase lag, taxa de multiplicação e concentração máxima final, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

3.6 Extrações de RNA

As 22 cepas de *L. monocytogenes* e a cepa Scott A (Tabela 2), adicionalmente às cepas selvagens (J1-194 e X1-001) e mutantes ($\Delta sigB$) citadas na Tabela 3, foram cultivadas até o início da fase estacionária conforme descrito em 3.3. A seguir, 1mL dessas culturas foi transferido para 99 mL de caldo BHI (aw 0,94), para obtenção de aproximadamente 10^7 UFC/mL, sendo em seguida incubadas a 25°C, sem agitação, durante 30 minutos, para a máxima expressão de *sigB* (OLIVER et al., 2010).

As amostras de RNA foram extraídas das culturas bacterianas de acordo com o protocolo descrito por Bergholz et al. (2012). Resumidamente, o RNA das cepas de *L. monocytogenes* foi extraído a partir de 100ml de BHI aw 0,99 (sem cloreto de sódio), bem como das mesmas cepas mantidas em BHI com aw 0,94, conforme descrito em 3.3. Os processos de síntese e degradação do RNA bacteriano foram bloqueados pela adição de 10ml de fenol-etanol (1:10, volume/volume) aos 100ml de cultura, seguidos por agitação e centrifugação a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C. Os *pellets* obtidos foram ressuspensos em *TriReagent* (Ambion, USA) e homogeneizados por 4 minutos em FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) com *beads* de zircônia (0,1mm; tratadas com solução de HCl 1N). Após a homogeneização foi seguido o protocolo descrito pelo fabricante para o *TriReagent*.

O RNA total extraído foi incubado com RNasin (Promega, USA), para inibir a presença de possíveis RNases, e também com RQ1 DNase (Promega) com intuito de remover possíveis contaminações com DNA. A seguir, foi realizada a quantificação do RNA por espectrofotometria, com auxílio do equipamento NanoDrop 2000c (Thermo). A qualidade do RNA foi verificada com o equipamento Bioanalyzer (Agilent, USA), e apenas amostras com o parâmetro *RNA Integrity Number* (RIN) > 8.0 foram utilizadas para as análises subsequentes. O RNA purificado foi armazenado em água livre de RNase a -70°C, por um período não superior a 30 dias, até que fosse utilizado para os ensaios subsequentes de *microarray* e RT-PCR *real time*.

3.7 Análise da expressão gênica em cepas de *L. monocytogenes* linhagem I e II

A análise da expressão gênica de *L. monocytogenes* foi realizada nas culturas celulares das cepas J1-194 (linhagem I), X1-001 (linhagem II) e suas respectivas mutantes isogênicas $\Delta sigB$ (Tabela 3) preparadas conforme descrito em 3.5 e 3.6.

Os *arrays* para *L. monocytogenes* (versão 2.0) utilizados neste estudo foram produzidos pelo “The Pathogen Functional Genomics Resource Center (PFGRC)/J. Craig Venter Institute (JCVI)” e gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Wiedmann (*Food Safety Lab.*, Cornell University, USA). Os *slides* foram produzidos com 6.347 oligonucleotídeos de 70mer, em quadruplicata, representando o genoma de quatro cepas diferentes de *L. monocytogenes* - EGD-e (1/2a), F6854 (1/2a), F2365 (4b) e H7858 (4b).

A síntese do cDNA, a partir das amostras de RNA extraídas conforme o item 3.6, e a marcação com fluoróforos foi realizada a partir de 10µg de RNA total, com o auxílio do kit *SuperScript Plus Indirect cDNA Labeling System for DNA Microarrays* (Invitrogen, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O kit *DNA GFX DNA and Gel Band Purification* (GE HealthCare, USA) foi utilizado na purificação do cDNA, após a transcrição reversa e incorporação dos fluoróforos (Cy3 e Cy5). As etapas de eluição foram realizadas sempre com água livre de RNase. O cDNA marcado e purificado foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop) para determinação da frequência de incorporação, a qual é definida como o número de nucleotídeos (nt) marcados por 1.000 nt de cDNA. Amostras com frequências de incorporação entre 20 e 50 foram utilizadas para as hibridizações nos *arrays*.

Os cDNA marcados e purificados das cepas selvagens e suas correspondentes *ΔsigB* foram combinados e concentrados a vácuo até a completa secagem. Os alvos combinados (cDNA selvagem + cDNA mutante) foram ressuspensos em 50µl de tampão de hibridização (0,5x formamida; 5x SSC - NaCl/Citrato Trissódico; 0,1% dodecil sulfato de sódio - SDS; 0,1mM DTT e 600µg/ml de DNA de esperma de salmão). A seguir, os cDNA alvos foram agitados em vórtex durante 1 minuto e desnaturados a 95°C por 5 minutos.

O volume total de 50µl de cada amostra foi aplicado sobre um *slide* de *microarray* e coberto com uma lamínula, sendo a seguir, armazenado em câmara de hibridização e incubado em banho-maria a 42°C por 18-20h. As lavagens dos slides pós-hibridização foram realizadas por 5 minutos em tampão 2x SSC contendo 0,1% de SDS, 5 minutos em tampão 2x SSC e mais uma lavagem em nova solução tampão 2x SSC. Após uma etapa final de lavagem em água ultrapura, os slides foram secos por centrifugação e digitalizados com o GenePix 4000B Scanner (Molecular Devices, USA).

As análises e processamentos das imagens foram realizados conforme descrito por Raengpradub et al. (2008). O pré-processamento e as análises estatísticas foram realizados com auxílio do pacote *limma* disponibilizado pelo projeto BioConductor para ser utilizado no *software* R (GENTLEMAN et al., 2004; SMYTH, 2005). A correção de *background* foi realizada com o método *normexp* com intuito de produzir taxas mais robustas para os *spots*

com baixa intensidade. Além disso, foi utilizada a normalização *print tip* para correção de efeitos espaciais e viés de intensidade dos corantes (SMYTH, 2003). A abordagem empírica de Bayes foi utilizada para avaliar a expressão diferencial (*fold change*) (SMYTH, 2004). Três replicatas foram realizadas para cada comparação entre as cepas selvagem e sua isogênica *ΔsigB*. Os genes que apresentaram níveis de transcrição maiores na cepa selvagem em comparação à cepa isogênica mutante *ΔsigB* ($\geq 1,5$ -*fold change*), além de valores de $p < 0,05$, foram considerados diferencialmente e positivamente expressos.

3.8 Confirmação da expressão gênica por RT-PCR *real time*

A técnica de RT-PCR foi utilizada para as cepas J1-194 (linhagem I), X1-001 (linhagem II) e suas respectivas mutantes isogênicas *ΔsigB* (Tabela 3) com a finalidade de validar os resultados de expressão diferencial para alguns genes (Tabela 5), obtidos pela técnica de *microarray* (item 3.7). Depois de validados os perfis de expressão gênica, a RT-PCR também foi utilizada com os mesmos genes, para oito cepas de *L. monocytogenes* – quatro clínicas (8b, 14b, 20a e 22a – Tabela 2) e quatro de alimentos (1b, 6b, 8b e 14b), com o intuito de avaliar se os níveis de expressão gênica para essas cepas eram semelhantes aos obtidos com as cepas de referência e também para avaliar se os mesmos apresentavam diferentes padrões com relação à origem e/ou sorotipo (linhagem).

Os *primers* (Applied Biosystems) e sondas (Applied Biosystems) utilizadas neste estudo foram desenhados com o software Primer Express (Applied Biosystems) baseados em regiões conservadas de cada gene das cepas selvagens J1-194 e X1-001. Esse critério foi adotado com intuito de avaliar não somente as cepas utilizadas no *microarray*, mas também para utilizar os mesmos pares de *primers* e sondas na avaliação das cepas de *L. monocytogenes* citadas acima.

A partir do RNA extraído conforme 3.6, foi realizada a transcrição reversa (RT) de acordo com o protocolo descrito por Bergholz et al. (2010). O cDNA foi sintetizado a partir de 1mg de RNA total, com auxílio do kit *TaqMan Reverse Transcription* (Applied Biosystems). As reações de transcrição reversa continham tampão Taqman 1x; 5,5mM de cloreto de magnésio; 500mM de cada dNTP; 2,5mM de *random hexamers*; 4U de inibidor de RNase e 12,5 U de *Multi-Scribe Reverse Transcriptase*, e foram realizadas com os seguintes parâmetros: 25°C por 10 minutos, 48°C por 30 minutos e 95°C por 5 minutos. Reações contendo todos os reagentes citados acima, exceto a transcriptase reversa, foram preparadas para todas as amostras de RNA para determinação dos níveis de contaminação de DNA.

Diluições decimais seriadas do cDNA de cada amostra foram utilizadas para os ensaios de PCR *real time*. As reações (50ul) continham 50ng de RNA, Universal Mastermix TaqMan 1x (Applied Biosystems), 900 nmol de cada *primer*, 250 nmol de cada sonda TaqMan e foram realizadas com o equipamento ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), segundo os parâmetros: 48°C por 5 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

As eficiências de reação e *threshold cycle* (Ct) foram determinados utilizando o *software* ABI SDS v1.0 (Applied Biosystems). Todas as reações de RT-PCR foram realizadas em duplicata para cada amostra de cDNA testada. A expressão relativa foi determinada utilizando o método descrito por Pfaffl (2001), e os valores de Ct para *rpoB* foram utilizados para a normalização entre as amostras.

A avaliação estatística com relação à expressão gênica das cepas cultivadas em BHI com ou sem adição de sal foi avaliada através do teste *t-Student* pareado, ao nível de significância de 5%, de maneira independente para cada gene. Os valores obtidos foram log-transformados para obtenção de uma distribuição normal entre os dados.

Tabela 5. Genes selecionados e seus respectivos *primers* e sondas utilizados para avaliação dos níveis de expressão gênica nos ensaios de RT-PCR *real time*

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3') e sondas (6FAM*5'→3'MGB/NFQ**)	Referência
<i>lmo0398</i>	F [#] : CGCGAAAAAGAATACCGAACA R [#] : TGACTCCCAATCAATCGGTTC S [#] : CAGTACAACAATTAATCG	OLIVER et al. (2010)
<i>inIA</i>	F: GGTCTCACAAACAGATCTAGACCAAGT R: TCAAGTATTCCACTCCATCGATAGATT TCCCTAATCTATCCGCCTGAAGCGTTG	MCGANN et al. (2008)
<i>inIB</i>	F: GCAAATTTTTCCAGATGATGCTTT R: TGTCACTGCATCTGTACACTTTT S: CAGAAACAATCAAAGACAAT	MCGANN et al. (2008)
<i>inID</i>	F: AGATGAGAATTTAGCAAACGCAATAA R: CACTTGTAACAGCAGATGCA S: AACAACCTTAAGTAAACCTAG	MCGANN et al. (2007)
<i>fri</i>	F: CGGCGGAAGCCCATTC R: CTAAGTCTTCCATTAATTGATCCATTGT S: TATAAGGCGCTTCTTCTACGCTGGCATTCTTCT	CHAN et al. (2007)
<i>gltx</i>	F: GCGTGGATGTTCTTGAAAA R: TGTTGAATTAACGGTTCATAAATGG S: ACCTTACCGTCAATCG	OLLINGER et al. (2009)
<i>rpoB</i>	F: TGTAAAATATGGACGGCATCGT R: GCTGTTTGAATCTCAATTAAGTTTGG S: CTGATTTCGCGCAAACTTCTACGCG	SUE et al. (2004)

* 6FAM – fluoróforo incorporado na extremidade 5' das sondas

** MGB - *minor groove binder* e *quencher* não fluorescente, incorporados na extremidade 3' das sondas

[#]F: *forward*, R: *reverse*, S: sondas

Marrom – genes avaliados nas cepas da linhagem II de *L. monocytogenes*, Lilás – genes avaliados nas cepas da linhagem I, Verde – *housekeeping* gene

3.9 Avaliação da atividade hemolítica de cepas de *L. monocytogenes*

A atividade enzimática da listeriolisina (LLO) de todas as cepas de *L. monocytogenes* descritas nas Tabelas 2 e 3 (item 3.2) foi avaliada conforme descrito por Portnoy et al. (1988), com exceção da utilização de 0,5 mM de *dithiothreitol* (DTT) como agente redutor ao invés de cisteína. Resumidamente, diluições seriadas de culturas 24h foram preparadas em tampão fosfato salina (PBS) contendo 0,5 mM de DTT (pH 5,8), em seguida, cada cepa foi incubada a 37°C por 30 minutos, e após esse período, 1/10 (volume/volume) de uma solução de 10% de sangue desfibrinado de carneiro foi adicionado a cada amostra. A seguir, as amostras foram incubadas a 37°C por mais 30 minutos e centrifugadas a 2000rpm durante 1 minuto.

A lise das células de sangue de carneiro foi mensurada pela liberação de hemoglobina a 420 nm em um leitor de microplacas Multiskan FC (Thermo). Uma unidade hemolítica foi definida como o inverso da diluição do sobrenadante, na qual 50% dos glóbulos vermelhos do sangue de carneiro foram lisados. A hemólise completa foi observada pela adição de 10% Triton X-100 (1/100 volume) a uma amostra de sangue de carneiro.

O teste estatístico de Shapiro–Wilk foi utilizado para avaliar se as unidades hemolíticas apresentavam distribuição normal. Quando os dados apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste *t-Student*, e aqueles que não apresentaram distribuição normal foram avaliados quanto à presença de diferenças significativas entre os sorotipos e origens pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os resultados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

3.10 Avaliação da capacidade invasiva de *L. monocytogenes* em modelo de células epiteliais

A linhagem de células epiteliais Caco-2 (ATCC HTB-37) utilizada neste ensaio foi mantida em atmosfera modificada a 37°C (5% de CO₂, 85% de umidade relativa), em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco, USA) suplementado com 10% soro fetal bovino inativado (Invitrogen), 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, USA), 1mM de l-glutamina (Sigma-Aldrich), penicilina (100 U/mL) (Sigma-Aldrich) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Os ensaios de invasão foram realizados a 37°C, para todas as cepas descritas na Tabela 2, conforme protocolo descrito por GARNER et al. (2006).

As células de Caco-2 mantidas a 37°C foram transferidas 48h antes do ensaio (tempo necessário para fixação e formação de monocamada) para microplacas de 24 poços (Corning Inc., USA) contendo meio DMEM (sem antibióticos) a uma densidade aproximada de 5×10^4 células/poço. Durante o processo de infecção, aproximadamente 5×10^6 UFC de cada cepa de *L. monocytogenes* foi adicionada a cada poço (representando uma multiplicidade de infecção de aproximadamente 100). Antes da infecção, todos os inóculos foram preparados com auxílio da escalada de Mcfarland e diluições decimais seriadas. Os inóculos também foram semeados em ágar BHI (37°C, 24h) para posterior contagem e confirmação das populações.

Trinta minutos pós-infecção, as monocamadas de Caco-2 foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS), para remoção de bactérias que não aderiram às células, e uma nova alíquota de meio de cultura fresco (DMEM, sem antibióticos) foi adicionada. Quarenta e cinco minutos após a infecção, o meio de cultura foi substituído por outro DMEM contendo 150mg/mL de gentamicina para eliminar as bactérias que não invadiram as células. Aos 90 minutos pós-infecção, as monocamadas de Caco-2 foram lavadas três vezes com PBS e lisadas com outra solução de PBS contendo 0,1% de Triton X-100. As colônias de *L. monocytogenes* intracelulares foram contadas por semeadura a partir da solução lisada em ágar BHI (37°C por 24h).

Três experimentos de invasão independentes foram realizados, com cada amostra sendo avaliada em duplicata. A porcentagem relativa de invasão foi determinada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de invasão} = \frac{\text{UFC recuperadas}}{\text{UFC inóculo}} \times 100$$

As cepas X1-001, J1-194 e suas respectivas mutantes $\Delta sigB$ (Tabela 3), também foram avaliadas quanto ao seu potencial de invasão celular quando mantidas em BHI (a_w 0,99) a 25°C e depois de submetidas a uma incubação de 30 minutos em caldo BHI com a_w 0,94 na mesma temperatura, com o intuito de verificar tanto o papel do fator σ^B na virulência de cepas de *L. monocytogenes*, quanto com relação ao aumento ou não do potencial de invasão das

mesmas após contato com ambientes de elevado estresse osmótico. A cepa Scott A também foi avaliada com o mesmo propósito.

A comparação entre as eficiências de invasão das diferentes cepas (linhagem I e II) foi avaliada com auxílio do teste *t-Student*, após a normalização dos dados obtidos com relação à cepa X1-001 (Tabela 3) (considerada como 100% eficiente), pois a mesma é rotineiramente utilizada como controle em ensaios de invasão celular (FERREIRA et al., 2011). A avaliação dos resultados de eficiência de invasão para as cepas cultivadas em caldo BHI, com ou sem adição de sal, foi realizada com o teste *t-Student* pareado, ao nível de significância de 5%. Os resultados apresentados correspondem à média de três ensaios independentes, cada um em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da similaridade genética das cepas de *L. monocytogenes* por *MultiLocus Sequence Typing* (MLST)

Pela técnica de PCR foram amplificados, a partir das cepas de *L. monocytogenes*, sete genes *housekeeping*: *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh* e *lhkA* com sequências de 537, 399, 486, 462, 471, 453 e 480 pb, respectivamente. Todos os fragmentos de DNA amplificados foram sequenciados e inspecionados visualmente quanto a qualidade dos eletroferogramas obtidos.

As sequências obtidas para cada um dos genes avaliados foram alinhadas com aquelas depositadas no banco de dados do Instituto Pasteur (França), e dessa forma foram identificados diferentes alelos entre os genes – *abcZ* (4), *bglA* (5), *cat* (6), *dapE* (6), *dat* (7), *ldh* (5) e *lhkA* (3). Os resultados obtidos corroboram aqueles encontrados na literatura, os quais indicam os genes *cat*, *dapE* e *dat* como os mais recombinantes, além de sugerirem frequências de mutação reduzidas em *lhkA* (RAGON et al., 2008; PARISI et al., 2010).

A análise das sequências concatenadas para os sete loci gerou uma árvore filogenética (Figura 1) contendo as 22 cepas de *L. monocytogenes*, além das cepas Scott A, J1-194 e X1-001. Ao observarmos a similaridade genética das cepas estudadas, nota-se que dois grandes grupos foram formados, um deles contendo apenas cepas da linhagem II (Figura 1 – Vermelho) e outro contendo apenas cepas da linhagem I, incluindo a cepa J1-194 (sorotipo 1/2b) que embora esteja um pouco afastada das demais cepas, possivelmente foi originada a partir de um ancestral comum. Por outro lado, a partir da análise dos sete genes sequenciados é possível inferir que as 22 cepas de *L. monocytogenes* não representam clones, podendo ser consideradas geneticamente distintas. Essa observação corrobora os resultados obtidos em uma análise prévia por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (dados não apresentados).

A partir da árvore filogenética gerada, também foi possível notar que, no interior de cada grupo (linhagem I e II), cepas de origem alimentar diferiram daquelas de origem clínica, indicando que as mutações e recombinações também podem estar relacionadas à pressão seletiva que o ambiente exerce sobre as diferentes cepas. As únicas exceções foram as cepas 21a e 22a que se aproximaram ao grupo das cepas de origem alimentar da linhagem II

Figura 1. Árvore filogenética obtida pelo método estatístico de *maximum likelihood* a partir das sequências concatenadas obtidas dos genes *abcZ*, *bglA*, *cat*, *dapE*, *dat*, *ldh*, *lhkA* para as cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II, isoladas de amostras clínicas e alimentos. Os valores em cada nó da árvore representam *bootstraps* > 60% (reconstituição filogenética).

4.2 Avaliação do estresse osmótico na multiplicação de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas

A indústria de alimentos, frequentemente utiliza o sal como um agente conservante e antibacteriano devido aos seus efeitos inibitórios na multiplicação de bactérias tanto em produtos salgados e secos como em alimentos prontos para consumo (RTE) a base de carnes e peixes, além de alimentos fermentados tais como salame, queijos e pickles. Além disso, o sal é considerado como um aditivo essencial para aumentar o sabor, auxiliar na textura e vida útil dos alimentos em geral (DESMOND, 2006). Células bacterianas podem sofrer danos irreversíveis na presença do sal à medida que modificações no seu balanço osmótico não sejam superadas (CSONKA, 1989).

L. monocytogenes consegue se adaptar de maneira eficiente e muitas vezes se multiplicar em baixas temperaturas, pH reduzido e elevadas concentrações de sal (NaCl), condições estas utilizadas na preservação de muitos alimentos RTE (LIANOU e SOFOS, 2007). Avanços com relação às medidas de segurança alimentar tomadas contra esse patógeno dependem da caracterização completa dos mecanismos de resposta celulares e moleculares apresentados em diferentes condições de estresse ambiental.

Baseado em dados encontrados em diferentes estudos (FARBER et al., 1992; LIU et al., 2005) que descrevem as piores condições osmóticas em que a multiplicação de *L. monocytogenes* pôde ser detectada, foram definidos três níveis de atividade de água (a_w) - 0,88; 0,91 e 0,94 - para que algumas cepas fossem testadas quanto à resistência ao estresse osmótico quando mantidos em diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 25°C). Além disso, tais parâmetros estão diretamente relacionados às condições osmóticas encontradas em produtos alimentícios, tais como queijos maturados, embutidos cárneos e outros alimentos RTE a base de carnes e peixes.

O critério para escolha das temperaturas foi baseado na sua utilidade para simular condições reais de produção, armazenamento e comercialização. Assim, a temperatura de 4°C foi utilizada para avaliar o comportamento das cepas de *L. monocytogenes*, linhagens I e II, na condição ideal de armazenamento de produtos alimentícios, tanto no âmbito doméstico, quanto na indústria de alimentos; 10°C foi escolhida por representar uma temperatura de abuso que pode ocorrer nos mesmos ambientes devido ao mau funcionamento dos refrigeradores ou ainda pela regulação inadequada dos mesmos. Já 25°C foi selecionada por

representar a temperatura ambiente tanto residencial, como em pontos de comercialização de alimentos.

Ao analisarmos em conjunto o comportamento das cinco cepas selecionadas para o teste a 4°C (Figura 2), podemos notar que a atividade de água 0,88 foi aquela em que as cepas testadas apresentaram maior dificuldade de adaptação e as maiores tendências de redução populacional durante o período de análises. Já para a *aw* 0,91, as cepas também não conseguiram se adaptar, apresentando decréscimo populacional, porém mais lento em comparação a *aw* 0,88. Por último, a *aw* 0,94 foi aquela em que todas as cepas testadas, ao final de 40 dias, se mantiveram viáveis com tendências de aumento populacional, por exemplo, a cepa Scott A (Figura 2A) aumentou sua população em aproximadamente 0,5 log UFC/ml com relação ao seu inóculo.

continua

Figura 2. Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* (**A** - Scott A; **B** - 2b; **C** - 14b; **D** - 9a; **E** - 21a), quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água (0,88 – 0,91 – 0,94) a 4°C. (Consultar Tabela 2 para sorotipo e origem das cepas).

Na Figura 3 é possível observar o comportamento das mesmas cinco cepas quando incubadas a 10°C, sendo que tanto a atividade de água 0,88, quanto de 0,91 foram prejudiciais para as cepas, e ao final do período de análise não foi possível a detecção das cepas 14b e 9a na a_w 0,88 (Figura 3C e 3D). Já para a a_w 0,94 foi possível observar que todas as cepas apresentaram, ao final de 40 dias, multiplicação exponencial com aumento de até 3 log UFC/ml (Figura 3A e 3B).

continua

Figura 3. Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* (A - Scott A; B - 2b; C - 14b; D - 9a; E - 21a), quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água (0,88 – 0,91 – 0,94) a 10°C. (Consultar Tabela 2 para sorotipo e origem das cepas).

Para a temperatura de 25°C, ao ser analisado o comportamento das cepas (Figura 4), é possível notar que tanto a atividade de água 0,88, quanto de 0,91 também foram prejudiciais para as mesmas, sendo que todas as cepas apresentaram tendências de decréscimo populacional, até praticamente não serem mais detectadas no décimo dia de incubação. Já para a a_w 0,94 foi possível observar que as cinco cepas avaliadas apresentaram, ao final dos dez dias, multiplicação exponencial acentuada, indicando que a melhor condição na qual as cepas de *L.monocytogenes* conseguiriam se adaptar e multiplicar seria de a_w 0,94, tendência esta também observada nos testes a 4°C e 10°C.

continua

Figura 4. Curvas de multiplicação de cinco cepas de *L. monocytogenes* (A - Scott A; B - 2b; C - 14b; D - 9a; E - 21a), quando cultivadas em caldo BHI com diferentes atividades de água (0,88 – 0,91 – 0,94) a 25°C. (Consultar Tabela 2 para sorotipo e origem das cepas).

Os resultados observados para as três atividades de água estão de acordo com outros estudos realizados com cepas de *L. monocytogenes* em situações de estresse osmótico, os quais reportam a_w 0,88 a 0,91 como sendo extremamente prejudiciais para multiplicação e sobrevivência, e a_w 0,93 a 0,94 como valores mínimos para multiplicação deste patógeno (TIGANATIS et al., 2009; GOUNADAKI et al., 2007; KOUTSOUMANIS et al., 2004). Dessa forma, a a_w 0,94 foi selecionada para avaliação comportamental das cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b (linhagem I) e 1/2a (linhagem II) quando submetidas ao estresse osmótico em diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 25°C), uma vez que estes micro-organismos possivelmente encontrem condições semelhantes a esta na indústria de alimentos e nos ambientes domésticos e comerciais.

4.3 Avaliação comportamental de *L. monocytogenes* cultivada em ambiente com elevado estresse osmótico (a_w 0,94) e em diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 25°C)

No presente estudo, cinco cepas de *L. monocytogenes*, representando as linhagens I e II (entre as mais frequentemente isoladas em casos clínicos e alimentos) foram submetidas a um teste piloto com diferentes atividades de água (0,88 – 0,91 – 0,94; baseadas na adição do umectante NaCl) e sob diferentes temperaturas (4°C, 10°C e 25°C) para se detectar a pior condição de estresse na qual as cepas apresentariam multiplicação (ou sobrevivência). A a_w selecionada para as avaliações posteriores foi de 0,94, ou seja, atividade esta atingida após a adição de 11% de NaCl (p/v).

Na Figura 5 estão apresentadas as curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas. Conforme pode ser verificado na Figura 5A, o comportamento de multiplicação e a população final atingida por todas as cepas de origem alimentar foram semelhantes, com aumento máximo de até 1 log UFC/mL, quando incubadas a 4°C em meio de cultivo com a_w 0,94. Entretanto também é possível observar que durante os 73 dias avaliados todas as cepas permaneceram com suas células viáveis.

No que diz a respeito às cepas pertencentes ao sorotipo 4b, de origem clínica (Figura 5B), é possível observar que as mesmas apresentaram três tipos de comportamentos distintos. O primeiro, reunindo as cepas 8b e 12b, as quais conseguiram se multiplicar e elevar sua população inicial em até 2 log UFC/mL; o segundo com as cepas 14b, 16b e 18b,

apresentando perfil semelhante ao observado pelas cepas de origem alimentar (Figura 5A), ou seja, estabilidade com viabilidade celular da população ao longo dos 73 dias de incubação; e por último, a cepa 17b que apresentou um declínio gradual em sua população ao longo dos 73 dias avaliados.

Figura 5. Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos (**A**) e amostras clínicas (**B**) quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 4°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

A Figura 6 apresenta os resultados obtidos com as 10 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, isoladas de amostras clínicas e alimentos, quando submetidas à incubação a 4°C em caldo BHI (*aw* 0,94). Conforme pode ser observado na Figura 6A, três das quatro cepas de origem alimentar mantiveram suas populações constantes o longo dos 73 dias de incubação, ou seja, não apresentaram taxa de multiplicação exponencial, nem de morte. Apenas a cepa 10a não foi capaz de manter sua viabilidade e a partir do 24º dia iniciou um declínio populacional até não ser mais detectada no 73º dia.

No geral, o comportamento apresentado pelas cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a (Figura 6A), provenientes de amostras de origem alimentar, foi semelhante ao observado para as cepas de sorotipo 4b, também de origem alimentar (Figura 5A), ou seja, a redução da temperatura em combinação com a presença de elevada concentração de sal (11%) não foi suficiente para ocasionar a redução da população do micro-organismo, pelo contrário, a grande maioria das cepas manteve sua viabilidade ao longo de 73 dias ou ainda, algumas cepas, conseguiram se multiplicar e aumentar até 1 log UFC/mL em suas populações.

Com relação ao comportamento apresentado pelas cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, isoladas a partir de amostras clínicas, é possível observar na Figura 6B que o comportamento das cepas foi heterogêneo, ou seja, as cepas 19a, 20a e 22a apresentaram declínio em suas populações entre o 1º e o 5º dia de incubação sendo que após o 38º dia não foi possível mais detectá-las. Já a cepa 15a também apresentou declínio, porém de maneira mais gradual ao longo do tempo. Apenas as cepas 13a e 21a apresentaram um comportamento semelhante ao das cepas 14b, 16b e 18b (Figura 5B), ou seja, se mantiveram viáveis, com aumento de até 1 log UFC/mL.

O comportamento apresentado pela grande maioria das cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a e 4b avaliadas nesse estudo, ou seja, apresentar capacidade de multiplicação ou de se manter viáveis ao longo de 73 dias de incubação a 4°C, representa um sério problema para indústria de alimentos. Isso porque a mesma normalmente se utiliza de técnicas tais como redução de temperatura e adição de umectantes como medidas de controle de micro-organismos patogênicos que possam estar presentes em produtos alimentícios.

Não foi possível o cálculo da duração de fase lag, taxa de multiplicação específica máxima e concentração celular final das cepas de *L. monocytogenes*, tanto de sorotipo 4b quanto 1/2a, independentemente da origem de isolamento (Figuras 5 e 6) devido à falta de multiplicação exponencial ou ao declínio populacional observado. Assim, nenhum teste estatístico foi aplicado, sendo as comparações entre os diferentes sorotipos realizadas de acordo com a inspeção visual dos gráficos de multiplicação.

Figura 6. Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir de alimentos (**A**) e amostras clínicas (**B**) quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 4°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Como controle para essas avaliações, utilizou-se a cepa de *L. monocytogenes* Scott A e uma cepa de *L. innocua*. Observa-se na Figura 7 que ambas as cepas mantiveram suas populações praticamente constantes durante os 73 dias de incubação. O comportamento apresentado pelas cepas se aproximou ao observado para a maioria das cepas de *L. monocytogenes*, tanto do sorotipo 4b, quanto 1/2a, indicando que todos os parâmetros utilizados tais como meio de cultura, preparo do inóculo, tempo de incubação, etc., estavam padronizados, permitindo analisar de forma comparativa os comportamentos observados.

Figura 7. Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 4°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Ao se analisar o comportamento apresentado pelas 22 cepas de *L. monocytogenes*, foi possível verificar que as cepas de origem alimentar, de ambos os sorotipos, apresentaram comportamento semelhante, ou seja, conseguiram se multiplicar em pequenas proporções ou mesmo se mantiveram viáveis durante os 73 dias de incubação em um ambiente de elevado estresse osmótico; em contrapartida, a maioria das cepas de origem clínica apresentou dificuldade em se manter viável ao longo do tempo com diversas cepas apresentando redução populacional acentuada.

Através dos comportamentos apresentados pelas cepas de *L. monocytogenes* de sorotipo 4b e 1/2a, independente da origem de isolamento, foi possível observar que as cepas do

sorotipo 4b conseguiram se adaptar mais facilmente ao ambiente de elevado estresse osmótico e temperatura reduzida uma vez que a maioria manteve sua viabilidade celular, enquanto as cepas do sorotipo 1/2a encontraram mais dificuldades para sobreviver nessas condições (Figuras 5 e 6).

Dados disponíveis na literatura (JUNTTILA et al., 1988; BUNCIC et al., 2001) apontam para uma melhor adaptação de cepas do sorotipo 1/2a em relação ao sorotipo 4b, quando as mesmas são submetidas a temperaturas de refrigeração em condições ideais de multiplicação, entretanto, quando ambos os sorotipos são submetidos ao estresse osmótico, a capacidade de adaptação dos dois sorotipos se inverte, com as cepas do sorotipo 4b se adaptando melhor em relação às cepas 1/2a. Essa observação possivelmente está relacionada aos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos na resposta ao estresse osmótico e temperaturas reduzidas entre os diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*.

Quando as cepas pertencentes ao sorotipo 4b foram incubadas em meio de cultivo com a_w 0,94 a 10°C (Figura 8), observou-se comportamentos muito distintos com relação aos obtidos a 4°C. Todas as cepas provenientes de amostras de alimentos (Figura 8A) apresentaram comportamentos semelhantes, ou seja, duração média da fase lag de 135 horas (aproximadamente cinco dias), taxas de multiplicação média de 0,047 log UFC/mL/dia, além de atingirem, em média, concentrações populacionais finais de 8,40 log UFC/mL (Tabela 6).

As seis cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b de origem clínica (Figura 8B) também conseguiram sobreviver e apresentar taxas de multiplicação, semelhante ao ocorrido com as cepas de origem alimentar. Entretanto, é possível observar que a duração média da fase lag para esse grupo de cepas foi de 170 horas (aproximadamente sete dias), a taxa média de multiplicação atingiu 0,018 log UFC/mL/dia, e as concentrações populacionais finais foram, em média, de 8,76 log UFC/mL (Figura 8B e Tabela 6). Não foi possível determinar, com o modelo de Baranyi implementado no *software* R, a concentração populacional final para algumas das cepas avaliadas (Tabela 6), provavelmente, pois as mesmas ainda estavam em fase logarítmica ao final do período avaliado.

Embora tenha ocorrido uma aparente diferença entre o comportamento das cepas de *L. monocytogenes*, estatisticamente essas diferenças não puderam ser comprovadas, ou seja, quando comparamos a duração da fase lag, a taxa de multiplicação e a concentração populacional máxima entre as cepas de origem clínica e alimentos, não se observou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Figura 8. Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos (A) e amostras clínicas (B) quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 10°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

A grande maioria das cepas pertencentes ao sorotipo 1/2a (Figuras 9A e 9B), independente de sua origem, mostrou-se resistente às condições avaliadas, sendo que após uma ligeira queda na população inicial as cepas apresentaram taxas de multiplicação variando de 0,014 a 0,016 log UFC/mL/dia (Tabela 6).

Especificamente, quando as quatro cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a isoladas de alimentos foram incubadas em meio de cultivo com *aw* 0,94 a 10°C, uma delas (cepa 10a) não conseguiu sobreviver a essa condição, apresentando um declínio em sua população, não sendo mais detectada no 42º dia. Já as cepas 9a, 11a e 12a conseguiram se adaptar às condições do meio e apresentaram duração média da fase lag de 145 horas (aproximadamente seis dias), taxa média de multiplicação de 0,020 log UFC/mL/dia, e concentração populacional final de 8,35 log UFC/mL (Figura 9A e Tabela 6). Não foi possível determinar com o modelo de Baranyi a concentração populacional final da cepa 9a (Tabela 6).

As seis cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a de origem clínica (Figura 9B) também conseguiram sobreviver e se multiplicar de maneira semelhante ao ocorrido com as cepas de origem alimentar. Observa-se que a duração média da fase lag para esse grupo de cepas foi de 189 horas (aproximadamente oito dias), com taxa média de multiplicação de 0,017 log UFC/mL/dia, e concentrações populacionais finais, em média, de 8,76 log UFC/mL (Tabela 6).

Uma vez que foi possível observar comportamentos semelhantes entre a maioria das cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, tanto de origem clínica quanto de alimentos, estatisticamente este fato também se confirmou, ou seja, quando comparamos a duração da fase lag, taxa de multiplicação máxima e a concentração populacional final, todos esses parâmetros não apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$).

Tabela 6. Parâmetros de multiplicação das 22 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b e 1/2a isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos, quando incubadas em caldo BHI (a_w 0,94) a 10°C.

Cepa*	Sorotipo	Origem	Duração Fase Lag (h)	Taxa de multiplicação (log UFC/mL/dia)	Concentração inicial (log UFC/mL)	Concentração final (log UFC/mL)
1b	4b	Alimentos	111,28	0,020	4,33	8,45
2b	4b	Alimentos	135,33	0,021	4,42	8,52
3b	4b	Alimentos	153,04	0,018	4,29	8,47
4b	4b	Alimentos	116,69	0,190	4,24	8,20
6b	4b	Alimentos	151,97	0,016	4,38	8,37
7b	4b	Alimentos	141,19	0,017	4,45	8,53
8b	4b	Clínica	116,42	0,023	4,45	8,89
12b	4b	Clínica	113,76	0,024	4,21	8,86
14b	4b	Clínica	68,29	0,012	4,15	ND
16b	4b	Clínica	116,79	0,021	4,24	8,71
17b	4b	Clínica	263,83	0,023	4,25	8,41
18b	4b	Clínica	165,64	0,010	4,43	ND
9a	1/2a	Alimentos	92,13	0,014	4,19	ND
11a	1/2a	Alimentos	168,06	0,023	4,30	8,35
12a	1/2a	Alimentos	175,30	0,025	4,35	8,35
13a	1/2a	Clínica	124,55	0,020	4,19	8,96
15a	1/2a	Clínica	389,92	0,013	3,83	ND
19a	1/2a	Clínica	210,74	0,021	4,06	8,62
20a	1/2a	Clínica	200,74	0,026	4,15	8,36
21a	1/2a	Clínica	184,15	0,015	4,09	ND
22a	1/2a	Clínica	182,16	0,014	3,72	ND
Scott A	4b	Clínica	168,00	0,012	4,25	ND

*A cepa 10a, de origem alimentar não apresentou taxa de multiplicação nas condições estudadas.

ND – Não determinada pelo modelo utilizado (Baranyi)

Figura 9. Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir alimentos (A) e amostras clínicas (B) quando cultivadas em caldo BHI com *aw* 0,94 a 10°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

A cepa de referência *L. innocua* não foi capaz de se multiplicar nas condições de teste, apresentando declínio na população após o 11^o dia, não sendo mais detectada após o 28^o dia de incubação, indicando a dificuldade dessa espécie para se adaptar a essa condição. Já a cepa Scott A, por sua vez, demonstrou uma adaptação ao estresse osmótico e, após o 42^o dia de incubação, sua população já havia aumentado em 4,5 ciclos logarítmicos (Figura 10).

Figura 10. Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 10°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Quando incubadas a 25°C em meio de cultivo com a_w 0,94 as cepas de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e pertencentes ao sorotipo 4b (Figura 11A) apresentaram duração da fase lag média de 28 horas (Tabela 7). Depois de superada a fase lag as mesmas apresentaram uma taxa média de multiplicação de 0,133 log UFC/mL/dia, até aproximadamente o quinto dia de incubação. Já a partir do oitavo dia de incubação as cepas atingiram sua concentração populacional máxima que apresentou valor médio de 8,7 log UFC/mL (Figura 11A e Tabela 7).

Por outro lado, as cepas de origem clínica puderam ser divididas em dois grupos, o primeiro apresentando comportamento semelhante ao observado para as cepas de origem alimentar, ou seja, duração média da fase lag de 33 horas, taxa média de multiplicação de 0,123 log UFC/mL/dia e concentrações populacionais finais de 8,4 log UFC/mL (Figura 11B e Tabela 7). O segundo grupo (cepas 17b e 18b) apresentou duração média de fase lag maior (91 horas), taxa média de multiplicação menor (0,100 log UFC/mL/dia) e atingiu densidade populacional média semelhante em comparação ao primeiro grupo (Figura 11B e Tabela 7).

Ao analisar os resultados obtidos para este sorotipo, foi possível observar alguns comportamentos distintos entre as cepas de *L. monocytogenes*, sendo os mesmos comprovados estatisticamente. Com relação à fase lag, as cepas clínicas apresentaram maior duração ($p < 0,05$) em comparação às cepas de origem alimentar; já as concentrações populacionais finais atingidas pelas cepas de origem alimentar foram maiores ($p < 0,05$) em relação às cepas clínicas. Esses resultados indicam que as cepas de origem clínica precisam de um tempo maior para adaptação do seu metabolismo à elevada pressão osmótica, enquanto as cepas de origem alimentar conseguem se adaptar de maneira mais rápida e eficaz, atingindo concentrações populacionais finais maiores.

Figura 11. Curvas de multiplicação das 12 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b, isoladas a partir de alimentos (**A**) e amostras clínicas (**B**) quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 25°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Com exceção das cepas 15a e 22a, as demais cepas pertencentes ao sorotipo 1/2a (Figuras 12A e 12B), independentemente de sua origem, mostraram-se resistentes às condições avaliadas, sendo que após a fase lag apresentaram taxas de multiplicação variando de 0,099 a 0,135 log UFC/mL/dia (Tabela 7).

Especificamente, as quatro cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a de origem alimentar (Figura 12A) conseguiram se adaptar ao meio e apresentaram fase lag média de aproximadamente 34 horas, taxa de multiplicação média de 0,112 log UFC/mL/dia, e concentrações populacionais finais médias de 8,24 log UFC/mL (Tabela 7).

Quando as seis cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, isoladas de amostras clínicas foram incubadas em meio de cultivo com *aw* 0,94 a 25°C (Figura 12B), uma delas (cepa 22a) não conseguiu sobreviver a essas condições e apresentou um declínio acentuado a partir do 12º dia. Já as cepas 19a, 20a e 21a conseguiram se adaptar às condições do meio e apresentaram duração média da fase lag de 30 horas, taxa média de multiplicação de 0,120 log UFC/mL/dia, e concentração populacional final de 8,33 log UFC/mL (Figura 12 e Tabela 7). A cepa 13a apresentou um comportamento intermediário com relação às outras cepas uma vez que sua fase lag foi mais duradoura e sua população final máxima foi inferior às cepas 19a, 20a e 21a.

Para as cepas de *L. monocytogenes* 1/2a de origem clínica e de alimentos incubadas a 25°C em caldo BHI com *aw* 0,94 não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os parâmetros fase lag, taxa de multiplicação máxima e a concentração populacional final.

Tabela 7. Parâmetros de multiplicação das 22 cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b e 1/2a isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos, quando incubadas em caldo BHI (a_w 0,94) a 25°C.

Cepa*	Sorotipo	Origem	Duração Fase Lag (h)	Taxa de multiplicação (log UFC/mL/dia)	Concentração inicial (log UFC/mL)	Concentração final (log UFC/mL)
1b	4b	Alimentos	29,15	0,140	4,55	8,68
2b	4b	Alimentos	25,50	0,123	4,39	8,52
3b	4b	Alimentos	31,92	0,142	4,61	8,70
4b	4b	Alimentos	28,41	0,138	4,53	8,83
6b	4b	Alimentos	28,65	0,133	4,53	8,88
7b	4b	Alimentos	23,99	0,127	4,43	8,77
8b	4b	Clínica	35,12	0,134	4,56	8,58
12b	4b	Clínica	36,08	0,134	4,47	8,45
14b	4b	Clínica	36,32	0,110	4,70	8,23
16b	4b	Clínica	28,30	0,123	4,49	8,47
17b	4b	Clínica	73,87	0,184	4,68	8,46
18b	4b	Clínica	49,15	0,060	4,58	8,35
9a	1/2a	Alimentos	44,43	0,123	4,45	8,06
10a	1/2a	Alimentos	34,79	0,099	4,28	8,41
11a	1/2a	Alimentos	27,39	0,107	4,40	8,39
12a	1/2a	Alimentos	30,79	0,119	4,48	8,10
13a	1/2a	Clínica	29,70	0,116	4,54	8,38
15a	1/2a	Clínica	151,84	0,057	4,14	7,14
19a	1/2a	Clínica	31,14	0,113	4,36	8,24
20a	1/2a	Clínica	33,53	0,114	4,51	8,14
21a	1/2a	Clínica	25,45	0,135	4,26	8,61
Scott A	4b	Clínica	25,95	0,119	4,48	8,51
<i>L. innocua</i>	NS	Ambiente	32,74	0,155	4,43	7,23

*A cepa 22a, de origem clínica não apresentou taxa de multiplicação nas condições estudadas.
NS - Amostra não sorotipada.

Figura 12. Curvas de multiplicação das 10 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, isoladas a partir de alimentos (**A**) e amostras clínicas (**B**) quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 25°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Ambas as cepas utilizadas como controles foram capazes de se multiplicar nas condições de teste, demonstrando uma adaptação ao estresse osmótico a essa temperatura (Figura 13). Entretanto a cepa de *L. monocytogenes* Scott A apresentou uma adaptação mais eficiente em relação à cepa de *L. innocua*, uma vez que é possível observar taxa de multiplicação maior e concentração populacional final mais elevada (Tabela 7). O comportamento apresentado pela cepa Scott A foi semelhante ao observado para a maioria das cepas do estudo expostas a essas mesmas condições.

Figura 13. Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* Scott A e *L. innocua* quando cultivadas em caldo BHI com a_w 0,94 a 25°C. (Consultar Tabela 2 para origem das cepas).

Ao realizar uma análise comparativa mais ampla, apenas considerando a origem de isolamento das cepas estudadas (clínica vs. alimentos) e desconsiderando a linhagem/sorotipo das mesmas, não foi possível identificar diferenças estatísticas ($p > 0,05$) com relação à duração da fase lag, taxa de multiplicação e concentração populacional final, tanto na temperatura de 10°C, quanto de 25°C. O fato das cepas de *L. monocytogenes* terem sido isoladas de alimentos ou amostras clínicas, não gerou diferenças comportamentais significativa quando as mesmas foram submetidas a situações de elevado estresse osmótico.

Todavia, ao serem comparados apenas os dois sorotipos (4b, linhagem I vs 1/2a, linhagem II), independentemente da origem de isolamento, foi possível observar que as cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 4b quando incubadas a 10°C em BHI com a_w 0,94, conseguiram se adaptar mais rapidamente às condições do meio e apresentaram menor fase lag ($p < 0,05$) em comparação às cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, quando submetidas às mesmas condições. Entretanto, não houve diferença estatística com relação a taxa de multiplicação e população final máxima nessa temperatura.

Comparando-se ainda as duas linhagens, as maiores diferenças estatística foram detectadas quando a mesma análise foi realizada a 25°C, ou seja, as cepas 4b apresentaram taxas de multiplicação e populações finais máximas maiores ($p < 0,05$) que as do sorotipo 1/2a. A duração de fase lag não diferiu neste temperatura.

Os resultados obtidos a partir das curvas de multiplicação demonstram a capacidade de cepas de *L. monocytogenes* de se adaptar a condições extremas de estresse osmótico. Uma das hipóteses para essa adaptação está relacionada ao acúmulo citoplasmático de “solutos compatíveis”, por exemplo, betaína, glicerol, sucrose e prolina, que auxiliam na manutenção da pressão osmótica intracelular sem alterar o metabolismo bacteriano (GUTIERREZ et al., 1995). O funcionamento desse sistema nas diferentes linhagens de *L. monocytogenes* ainda precisa ser elucidado.

A adição de cloreto de sódio e nitritos aos alimentos nem sempre é suficiente para inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* (FALEIRO et al., 2003; KESKINEN et al., 2008). Faleiro et al. (2003) demonstraram que algumas cepas de *L. monocytogenes*, após exposição a condições sub-letais de estresse osmótico, além de se tornar osmotolerantes, podem apresentar proteção cruzada (*cross-protection*) contra outras barreiras, como por exemplo, pH reduzido (ácido).

Assim, é de suma importância a análise do perfil de expressão gênica das duas principais linhagens de *L. monocytogenes* para tentar explicar as diferenças comportamentais em situações de estresse osmótico, uma vez que foi possível observar que não existe um comportamento homogêneo entre os sorotipos avaliados, havendo variações cepa-dependentes.

4.4 Avaliação da multiplicação das cepas *L. monocytogenes* 1/2a e 1/2b e suas respectivas mutantes isogênicas ($\Delta sigB$, $\Delta prfA$ e $\Delta sigB\Delta prfA$), sob estresse osmótico a 25°C

Uma vez que os resultados obtidos em 4.3 indicaram que diferenças estatísticas marcantes entre os sorotipos foram observadas quando as 22 cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 4b (linhagem I) e 1/2a (linhagem II), foram incubadas a 25°C, o estudo do perfil de expressão gênica e virulência foi realizado nessa condição com intuito de identificar, e caracterizar, possíveis diferenças entre os perfis de transcrição gênica das duas linhagens, com relação à importância do fator de virulência PrfA, e principalmente com relação ao papel do fator σ^B .

Devido aos elevados custos dos experimentos de *microarray* foram selecionadas duas cepas de referência, previamente utilizadas em outros estudos de expressão gênica (OLIVER et al., 2010; OLLINGER et al., 2009), representantes das linhagens I e II de *L. monocytogenes*, já que as mesmas são comumente envolvidas em casos de surto de origem alimentar e de listeriose. Não foi possível a utilização de uma cepa de referência 4b, uma vez que a cepa disponível não apresentou multiplicação nas condições estudadas. Assim, conforme os resultados obtidos pelo MLST (item 4.1) demonstraram que a cepa 1/2b se aproximou filogeneticamente das cepas sorotipo 4b, a mesma foi escolhida para os ensaios subsequentes.

O papel dos reguladores de transcrição, σ^B e PrfA, na sobrevivência de *L. monocytogenes* sob elevadas concentrações de sal, foi avaliado através de análises fenotípicas (σ^B e PrfA) e *microarray* (σ^B). Os dados gerados demonstraram que a mutação $\Delta sigB$ induz uma fase lag prolongada tanto nas cepas de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2b (linhagem I), como na sorotipo 1/2a (linhagem II), durante a multiplicação sob condições de estresse osmótico (Figura 14).

As quatro cepas pertencentes ao sorotipo 1/2a (Figura 14A), mostraram-se relativamente resistentes às condições avaliadas, sendo que após um curto período de fase lag apresentaram taxas de multiplicação variando de 0,104 a 0,208 log UFC/mL/dia (Tabela 8).

Especificamente, a cepa selvagem (sorotipo 1/2a) e sua mutante isogênica $\Delta prfA$ (Figura 14A) conseguiram se adaptar ao meio e apresentaram duração da fase lag média de 55 horas, taxa de multiplicação de 0,113 log UFC/mL/dia e concentração populacional final aproximada de 8,4 log UFC/mL (Tabela 8). Já as mutantes $\Delta sigB$ e $\Delta sigB\Delta prfA$, além de apresentarem maior duração de fase lag, por volta do sétimo dia de incubação (168h), começaram a reduzir suas populações.

As quatro cepas pertencentes ao sorotipo 1/2b (Figuras 14B), mostraram-se mais resistentes às condições avaliadas, ou seja, todas conseguiram se manter viáveis e multiplicar, sendo que após um curto período de fase lag apresentaram taxas de multiplicação variando de 0,099 a 0,117 log UFC/mL/dia (Tabela 8).

Neste caso, a cepa selvagem e sua mutante isogênica $\Delta prfA$ (Figura 14A) apresentaram em média, menor duração da fase lag (35 horas) em comparação às cepas mutantes $\Delta sigB$ e $\Delta sigB\Delta prfA$ (57 horas), taxa de multiplicação média de 0,105 log UFC/mL/dia para as cepas selvagem e mutante $\Delta prfA$ e 0,108 log UFC/mL/dia para as cepas mutantes $\Delta sigB$ e $\Delta sigB\Delta prfA$, e a concentração populacional final média de 7,8 log UFC/mL para as cepas selvagem e mutante $\Delta prfA$ e 8,3 log UFC/mL para as cepas mutantes $\Delta sigB$ e $\Delta sigB\Delta prfA$ (Tabela 8).

A

continua

Figura 14. Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* 1/2a (A) e 1/2b (B) e suas respectivas mutantes isogênicas ($\Delta sigB$, $\Delta prfA$ e $\Delta sigB\Delta prfA$) quando cultivada em caldo BHI com a_w 0,94 a 25°C.

Ao analisar o comportamento demonstrado pelas cepas selvagens das linhagens I e II e suas respectivas mutantes isogênicas, foi possível observar que para ambas linhagens, aquelas cepas que não possuíam o gene *sigB* ($\Delta sigB$ e $\Delta sigB\Delta prfA$) apresentaram duração de fase lag maior em relação às cepas selvagens e às $\Delta prfA$ ($p < 0,05$). Já com relação à taxa de multiplicação, observa-se diferença estatística significativa com relação à cepa duplo mutante $\Delta sigB\Delta prfA$, linhagem II (1/2a), que apresentou taxa de multiplicação maior em comparação a cepa selvagem ($p < 0,05$). Aparentemente, o fator PrfA não influi na adaptação ao estresse osmótico em cepas de *L. monocytogenes* uma vez que as cepas $\Delta prfA$ apresentaram comportamento semelhante às suas respectivas cepas selvagens.

Tabela 8. Parâmetros de multiplicação das oito cepas de *L. monocytogenes* 1/2b e 1/2a, quando incubadas em caldo BHI (a_w 0,94) a 25°C.

Cepa	Genótipo	Sorotipo	Duração Fase Lag (h)	Taxa de multiplicação (log UFC/mL/dia)	Concentração inicial (log UFC/mL)	Concentração final (log UFC/mL)
J1-194	Selvagem	1/2b	33,4	0,108	4,72	7,67
C6-001	$\Delta sigB$	1/2b	60,5	0,099	4,55	8,15
C6-004	$\Delta prfA$	1/2b	36,0	0,103	4,59	7,92
C6-005	$\Delta sigB\Delta prfA$	1/2b	54,0	0,117	4,55	8,45
X1-001	Selvagem	1/2a	60,9	0,104	4,60	8,35
A1-254	$\Delta sigB$	1/2a	115,5	ND	ND	ND
B2-046	$\Delta prfA$	1/2a	48,21	0,122	4,54	8,44
B2-068	$\Delta sigB\Delta prfA$	1/2a	101,5	0,208	4,51	7,05

ND – Não determinada pelo modelo utilizado (Baranyi e Roberts, 1994)

Estudos encontrados na literatura (OLESEN et al., 2009; BERGHOLZ et al., 2010) demonstram os efeitos do estresse osmótico para alguns genes específicos, entretanto, uma investigação em escala genômica global, das duas principais linhagens de *L. monocytogenes* em conjunto, ainda não foi realizada. Identificar interações entre a resposta ao estresse e a virulência, bem como a compreensão do comportamento gênico global do transcriptoma de *Listeria monocytogenes* em resposta ao estresse osmótico, pode fornecer informações de como esse patógeno sobrevive e se adapta às condições adversas encontradas na indústria alimentícia. Assim, as cepas selvagem e mutante $\Delta sigB$ foram selecionadas para os experimentos de *microarray*, com o objetivo de identificar possíveis genes diferencialmente expressos que estão sob regulação do fator de transcrição de resposta ao estresse e também virulência, Sigma B, bem como para explicar o papel desse regulador na duração da fase lag e multiplicação de *L. monocytogenes*.

Uma das limitações para realização de extrações de RNA em fase lag e consequentemente, a realização da técnica de *microarray*, está relacionada à baixa concentração do RNA extraído das amostras. Assim, a solução encontrada foi a manutenção das condições de multiplicação e incubação, mas com um inóculo maior (10^7 UFC/mL).

Com o intuito de confirmar o comportamento apresentado pelas cepas selvagem e mutante $\Delta sigB$, a curva de multiplicação foi repetida nas mesmas condições descritas

anteriormente, porém com o inóculo de aproximadamente 10^7 UFC/mL. A Figura 15 apresenta os resultados da curva de multiplicação, sendo que as cepas testadas apresentaram comportamento semelhante ao observado quando o inóculo foi de 10^4 UFC/mL, ou seja, apresentou fase lag mais prolongada e concentração populacional final na cepa mutante maior em relação à cepa selvagem.

Figura 15. Curvas de multiplicação das cepas *L. monocytogenes* 1/2b e sua mutante isogênica $\Delta sigB$, quando cultivada em caldo BHI com a_w 0,94 a 25°C com populações iniciais elevadas.

4.5 Análise da expressão gênica em cepas de *L. monocytogenes* linhagem I e II

O mecanismo pelo qual *L. monocytogenes* se adapta ao estresse osmótico não está completamente elucidado, além disso, também não há um consenso se os mecanismos de adaptação e virulência diferem entre as linhagens, principalmente com relação ao papel do fator σ^B . Dessa forma a análise da expressão gênica global foi realizada com cepas das linhagens I e II de *L. monocytogenes* quando mantidas em caldo BHI (*aw* 0,94) a 25°C. A avaliação da linhagem I foi realizada com a cepa J1-194 e sua respectiva mutante $\Delta sigB$ (Tabela 3), uma vez que a mesma já foi utilizadas em outros estudos de expressão gênica com essa finalidade (OLIVER et al., 2010), além de estar próxima filogeneticamente do grupo de cepas de sorotipo 4b, conforme verificado no ensaio de MLST (item 4.1).

Níveis de transcrição maiores em 173 genes na cepa selvagem (sorotipo 1/2b), quando comparada com sua mutante $\Delta sigB$, após a exposição de suas células em fase lag a 11% NaCl (durante 30 minutos), foram identificados (Tabela 9). Alguns desses genes já foram descritos na literatura por estarem envolvidos na resposta ao estresse e virulência, mas outros são genes pela primeira vez descritos como positivamente regulados por σ^B (Tabela 1 – Anexo). Também foram identificados 133 genes com regulação negativa de σ^B (dados não apresentados), ou seja, genes que apresentam menor expressão de seus produtos na presença de Sigma B.

Os resultados obtidos para a linhagem I confirmam que o *regulon* de σ^B inclui genes relacionados a resposta ao estresse (*csplA*, *lmo0903*, *lmo1601*) e virulência (*inlD*), bem como genes envolvidos com mecanismos de transporte e metabolismo. O tamanho do *regulon* de σ^B identificado pelo ensaio de *microarray* no presente estudo é consistente com aqueles identificados em outras bactérias tais como *B. subtilis* (127 genes) (PRICE et al., 2001) e *S. aureus* (198 genes) (BISCHOFF et al., 2004).

Tabela 9. Genes regulados positivamente por σ^B na cepa de *L. monocytogenes* linhagem I quando cultivada em caldo BHI (aw 0,94) a 25°C

Gene	Descrição de acordo com GeneBank	Fold Change (S-M)*
<i>lmo2391</i>	proteína conservada hipotética	25,19
<i>gabD</i>	Sucinato-semialdeído desidrogenase (NADPH+)	14,62
<i>lacD</i>	tagatose 1,6-bifosfato aldolase	13,22
<i>lmo0134</i>	acetiltransferase, família GNAT	12,25
<i>lmo0555</i>	transportador de oligopeptídeo próton-dependente	11,97
<i>inlD</i>	internalina D	8,07
<i>lmo1140</i>	proteína conservada hipotética	7,77
<i>lmo2454</i>	Desconhecido	7,26
<i>lmo0781</i>	sistema PTS (manose/frutose/sorbose). Componente IID	7,13
<i>glpK-2</i>	glicerol quinase	6,96
<i>lmo0782</i>	sistema PTS (manose/frutose/sorbose). Componente IIC	6,59
<i>lmo0610</i>	domínio proteico LPXTG	6,55
<i>lmo0169</i>	proteína de captação de glicose	5,84
<i>lmo0596</i>	similar a proteínas desconhecidas	5,77
<i>lmo2602</i>	proteína da família MgtC (membrana)	5,57
<i>lmo0628</i>	Desconhecido	5,27
<i>gadA</i>	glutamato descarboxilase gama (GAD)	5,18
<i>lmo2132</i>	proteína conservada hipotética	5,09
<i>lmo2494</i>	proteína PhoU (fosfato)	4,60
<i>lmo2174</i>	domínio proteico GGDEF	4,49
<i>lmo1241</i>	proteína conservada hipotética	4,47
<i>lmo0670</i>	proteína conservada hipotética	4,23
<i>lmo2269</i>	Desconhecido	4,23
<i>LMO2365_0800</i>	sistema PTS, componente IIAB	3,85
<i>lmo2256</i>	protease intracelular (família PfpI)	3,71
<i>lmo0602</i>	acetiltransferase, família GNAT	3,65
<i>lmo0655</i>	proteína da família das fosfatases (serina/treonina)	3,64
<i>rpoD</i>	RNA polimerase (fator sigma RpoD)	3,62
<i>lmo0530</i>	proteína conservada hipotética	3,51
<i>nagB</i>	glucosamina-6-fosfato isomerase	3,49
<i>lmo0197</i>	similar a proteína SpoVG de <i>B. subtilis</i>	3,25
<i>lmo2638</i>	proteína da família pirimidinas nucleotideo-disulfido oxidoredutase	3,17
<i>ldh-1</i>	L-lactato desidrogenase	3,14
<i>lmo0722</i>	piruvato oxidase	3,10
<i>glmS</i>	glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase	3,04
<i>lmo1068</i>	Desconhecido	2,97
<i>lmo2603</i>	proteína da família acetamidase/formamidase	2,83
<i>lmo0796</i>	proteína conservada hipotética	2,81
<i>lmo1602</i>	similar a proteínas desconhecidas	2,79
<i>arcA</i>	arginina deiminase	2,65
<i>cspLA</i>	similar a proteínas de choque (frio)	2,63

continua

continuação

Gene	Descrição de acordo com GeneBank	Fold Change (S-M)*
<i>gnd</i>	6-fosfogluconato desidrogenase	2,57
<i>lmo0527</i>	proteína de membrana putativa	2,54
<i>cysE</i>	serina O-acetiltransferase	2,47
<i>rpmF2</i>	proteína ribossomal L32	2,46
<i>aroK</i>	quinase chiquimato	2,44
<i>lmo0903</i>	proteína da família OsmC/Ohr	2,41
<i>lmo0186</i>	proteína homóloga YabE de <i>B. subtilis</i>	2,37
<i>lmo0669</i>	Oxidoreductase	2,33
<i>lmo1226</i>	proteína de membrana da família MmpL	2,29
<i>nrdA</i>	subunidade alfa de ribonucleosideo-difosfato redutase	2,29
<i>rpmF</i>	proteína ribossomal L32	2,24
<i>lmo2232</i>	domínio proteico CBS	2,22
<i>lmo0928</i>	DNA-3-metiladenina glicosilase	2,20
<i>cysK</i>	cisteína sintase A	2,19
<i>cysS</i>	cisteína-tRNA sintetase	2,18
<i>secE</i>	similar a subunidade da proteína translocase	2,16
<i>lmo0393</i>	proteína conservada hipotética	2,10
<i>lmo2671</i>	Desconhecido	2,09
<i>LMOh7858_2006</i>	quitinase	2,09
<i>lmo0019</i>	proteína conservada hipotética	2,09
<i>lmo1421</i>	transportador ABC glicina betaína/L-prolina	2,09
<i>adk</i>	adenilato quinase	2,08
<i>lmo0241</i>	RNA metiltransferase (família TrmH)	2,07
<i>guaB</i>	inosina-5-monofosfato desidrogenase	2,07
<i>lmo0242</i>	proteína conservada hipotética	2,07
<i>mraY</i>	fosfo-N-acetilmuramoil-pentapeptideo-transferase	2,06
<i>LMOj2365_1681</i>	sistema PTS (sucrose-especifico), componente IIBC	2,05
<i>resD</i>	similar ao regulador de resposta (ResD)	2,05
<i>lmo2031</i>	proteína hipotética e conservada	2,04
<i>lmo2231</i>	proteína de efluxo de cátions	2,04
<i>lmo0642</i>	proteína de membrana putativa	2,01
<i>lmo0529</i>	glicosil transferase	2,01
<i>lmo2795</i>	regulador de transcrição (família RpiR)	2,00
<i>hom</i>	homoserina desidrogenase	2,00
<i>lmo1601</i>	similar a proteína de estresse geral	1,99
<i>lmo1023</i>	domínio proteico TrkA	1,94
<i>lmo1071</i>	proteína de divisão celular (família FtsW/RodA/SpoVE)	1,94
<i>ald</i>	alanina desidrogenase	1,94
<i>lmo1541</i>	similar a proteínas desconhecidas	1,94
<i>lmo0653</i>	proteína conservada hipotética	1,93
<i>lmo0240</i>	proteína homóloga a YazC de <i>B. subtilis</i>	1,93
<i>ftsL</i>	similar a proteína de divisão celular FtsL	1,92

continua

continuação

Gene	Descrição de acordo com GeneBank	Fold Change (S-M)*
<i>lmo0010</i>	mevalonato quinase	1,92
<i>proS</i>	prolil-tRNA sintetase	1,91
<i>lmo2385</i>	similar a proteína YuxO de <i>B. subtilis</i>	1,91
<i>lmo0209</i>	Desconhecido	1,90
<i>lmo1708</i>	aminoglicoside N3-acetiltransferase	1,90
<i>lmo2217</i>	similar a proteínas desconhecidas	1,90
<i>lmo0135</i>	transportador ABC de oligopeptideo	1,90
<i>dapF</i>	diaminopimelato epimerase	1,89
<i>lmo2490</i>	proteína conservada hipotética	1,87
<i>lmo1751</i>	RNA metiltransferase (família TrmA)	1,85
<i>lmo0626</i>	proteína de membrana putativa	1,84
<i>lmo0415</i>	proteína da família de polissacarideo deacetilase	1,84
<i>rpsF</i>	proteína ribossomal S6	1,82
<i>pfkA</i>	6-fosfofrutoquinase	1,80
<i>lmo0051</i>	similar a proteína reguladora (AgrA de <i>Staphylococcus</i>)	1,79
<i>fbaA</i>	similar a frutose-1,6-bisfosfato aldolase	1,79
<i>folE</i>	GTP ciclohidrolase I	1,79
<i>lmo1020</i>	proteína conservada hipotética	1,79
<i>lmo2060</i>	domínio proteico MOSC	1,79
<i>glyA</i>	serina hidroximetiltransferase	1,79
<i>ctaA</i>	proteína de montagem de citocromo oxidase	1,78
<i>lmo0731</i>	Desconhecido	1,78
sigH	fator sigma de RNA polimerase	1,78
<i>rpmH</i>	ribossomal proteína L34	1,78
<i>lmo0407</i>	Desconhecido	1,77
<i>pheS</i>	fenilalanil-tRNA sintetase	1,77
<i>thrB</i>	homoserina quinase	1,77
<i>hepB</i>	heptaprenil difosfato sintase	1,77
<i>lmo0929</i>	proteína da família das sortase	1,76
<i>lmo0590</i>	domínio proteico DAK2	1,76
<i>lmo0819</i>	proteína conservada hipotética	1,75
<i>dapA</i>	dihidrodipicolinato sintase	1,75
<i>rplT</i>	proteína ribossomal L20	1,75
<i>lmo0388</i>	Desconhecido	1,75
<i>lmo1375</i>	similar a aminotripeptidase	1,75
<i>ftsA</i>	similar a proteína de divisão celular FtsA	1,75
<i>recJ</i>	exonuclease RecJ	1,75
<i>lmo2389</i>	proteína da família das pirimidinas nucleotideo-disulfido oxidoreductase	1,74
<i>scrK</i>	frutoquinase	1,74
<i>lmo1399</i>	similar a proteínas desconhecidas	1,73
<i>lmo1434</i>	proteína da família das metallo-beta-lactamase (hipotética)	1,72
<i>lmo0907</i>	proteína da família das fosfoglicerato mutase	1,72

continua

continuação

Gene	Descrição de acordo com GeneBank	Fold Change (S-M)*
<i>pyn</i>	pirimidina-nucleosideo fosforilase	1,71
<i>atpE</i>	ATP sintase	1,70
<i>lmo1239</i>	similar a proteína YsnA de <i>B. subtilis</i>	1,70
<i>ychF</i>	proteína YchF (regulador GTP)	1,69
<i>lmo2746</i>	proteína conservada hipotética	1,69
<i>lmo1021</i>	histidina quinase putativa	1,68
<i>lmo2740</i>	Desconhecido	1,68
<i>ispD</i>	4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintase	1,68
<i>lmo2163</i>	oxidoreductase (família Gfo/Idh/MocA)	1,67
<i>lmo0137</i>	proteína permease	1,66
<i>lmo2018</i>	proteína da família PAP2	1,65
<i>lmo0450</i>	proteína conservada hipotética	1,63
<i>glxX</i>	glutamil-tRNA sintetase	1,63
<i>lmo0164</i>	similar a proteína YabA de <i>B. subtilis</i>	1,62
<i>lmo0227</i>	proteína conservada hipotética	1,62
<i>lmo2634</i>	similar a proteína YbaF de <i>B. subtilis</i>	1,61
<i>lmo2759</i>	família das enzimas Appr-1-p	1,61
<i>htpX</i>	peptidase, família M48	1,61
<i>lmo0787</i>	proteína da família dos aminoácido permease	1,60
<i>trmB</i>	tRNA (guanina-N(7)-)-metiltransferase	1,60
<i>LMOj6854_0989.2</i>	proteína hipotética e conservada	1,60
<i>lmo0167</i>	proteínas da família tetrapirrole metilase	1,60
<i>lmo2690</i>	regulador de transcrição (família TetR)	1,60
<i>lmo2399</i>	domínio proteico CBS	1,59
<i>lmo2390</i>	pirimidina nucleotideo-dissulfido oxidoreductase	1,59
<i>mgsA</i>	metilglioal sintase	1,58
<i>lmo1790</i>	proteína da família das metallo-beta-lactamase (hipotética)	1,58
<i>mvaD</i>	difosfomevalonato decarboxilase	1,58
<i>lmo1649</i>	Desconhecido	1,58
<i>fhs</i>	tetrahidrofolato ligase	1,57
<i>rpsO</i>	proteína ribossomal	1,57
<i>upp</i>	similar a uracil fosforibosiltransferase	1,56
<i>lmo1394</i>	3-quetoacil redutase	1,56
<i>lmo2831</i>	beta-fosfoglucomutase	1,56
<i>menD</i>	2-oxoglutarate decarboxilase	1,56
<i>rsbW</i>	fator anti-sigma	1,55
<i>lmo0652</i>	acetiltransferase, família GNAT	1,54
<i>lmo0132</i>	inosine-5-monofosfato desidrogenase putativa	1,54
<i>pyrR</i>	proteína regulatória do operon PyrR	1,53
<i>lysS</i>	lisil-tRNA sintetase	1,53
<i>lmo0931</i>	proteína da família lipoiltransferase	1,53
<i>lmo2449</i>	ribonuclease R putativa	1,52

continua

continuação

Gene	Descrição de acordo com GeneBank	Fold Change (S-M)*
<i>lmo1670</i>	proteína conservada hipotética	1,52
<i>rpsK</i>	proteína ribossomal S11	1,52
<i>lmo0871</i>	proteína conservada hipotética	1,52
<i>lmo1065</i>	proteína conservada hipotética	1,51
<i>lmo0272</i>	família das hidrolases	1,51
<i>lmo1027</i>	similar a proteína YkqC de <i>B. subtilis</i>	1,50

*Fold change = Razão de mudança entre a cepa selvagem e a mutante ($\Delta sigB$).

Vermelho – genes em destaque

Já com relação a linhagem II, foram identificados níveis de transcrição maiores em 68 genes na cepa selvagem (sorotipo 1/2a), quando comparada com sua mutante $\Delta sigB$, após a exposição de suas células em fase lag a 11% NaCl (durante 30 minutos) (Tabela 10). Assim como ocorrido para linhagem I, alguns desses genes já foram descritos na literatura como regulados por σ^B , mas outros genes relacionados principalmente ao metabolismo ainda não haviam sido descritos (Tabela 1 – Anexo). Também foram identificados 85 genes com regulação negativa de σ^B (dados não apresentados).

Devido ao perfil de expressão gênico pouco similar entre as duas linhagens de *L. monocytogenes*, apenas cinco genes apresentaram expressão diferencial positiva em ambas as cepas, são eles *lmo0669* (oxidoreductase), *lmo0782* (sistema PTS), *lmo2602* (proteína hipotética), *lmo2603* (proteína hipotética) e *lmo2795* (fator de transcrição).

Estudos de transcrição gênica têm sido realizados com cepas selvagens de *L. monocytogenes* das linhagens I e II, evidenciando que os níveis de transcrição para a maioria dos genes σ^B -dependentes seriam maiores para a linhagem II em comparação à I (SEVERINO et al., 2007; OLIVER et al. 2010). Entretanto, os resultados obtidos nesse estudo indicam o perfil oposto quando as duas linhagens foram submetidas a uma situação de estresse osmótico e elevada temperatura, indicando que esse perfil provavelmente estaria relacionado a fatores ambientais e não genéticos de cada linhagem.

Tabela 10. Genes regulados positivamente por σ^B na cepa de *L. monocytogenes* linhagem II quando cultivada em caldo BHI (*aw* 0,94) a 25°C

Gene	Descrição de acordo com o GeneBank	Fold change (S-M)*
<i>lmo0515</i>	proteína hipotética	3,47
<i>lmo2213</i>	proteína ABM (biossíntese de monooxigenase)	3,27
<i>lmo2119</i>	proteína hipotética	3,25
<i>lmo2479</i>	proteína TPR (domínio tetratricopeptideo)	2,89
<i>lmo2045</i>	proteína hipotética	2,72
<i>lmo2594</i>	proteína hipotética	2,72
<i>lmo0303</i>	proteína putativa rica em lisina	2,58
<i>lmo0782</i>	similar ao sistema fosfotransferase manose-específico (PTS), IIC	2,54
<i>lmo2711</i>	proteína hipotética	2,51
<i>lmo0321</i>	proteína hipotética DsbD (citocromo C)	2,31
<i>lmo2795</i>	similar ao regulador de transcrição RpiR de <i>E. coli</i>	2,21
<i>lmo0279</i>	similar a redutase ribonucleosídeo-trifosfato (RNR_III)	2,17
<i>lmo2857</i>	proteína hipotética	2,00
<i>lmo0953</i>	proteína hipotética	2,00
<i>rpmJ</i>	proteína ribossomal L36	1,98
<i>lmo0398</i>	similar a fosfotransferase IIA	1,96
<i>lmo2266</i>	proteína MhpD (via de catecol)	1,96
<i>rplN</i>	proteína ribossomal 50S L14	1,95
<i>lmo2230</i>	similar a arsenato redutase (LMWPC)	1,95
<i>lmo0370</i>	proteína PhnA	1,95
<i>lmo2371</i>	similar a subunidade transmembrana do transportador ABC (MacB_PCD)	1,91
<i>inlB</i>	internalina B	1,91
<i>inlA</i>	internalina A	1,88
<i>lmo1908</i>	nucleosídeo trifosfato pirofosfohidrolase	1,86
<i>lmo2602</i>	proteína hipotética SapB	1,85
<i>lmo0524</i>	similar ao transportador sulfato SUL1	1,83
<i>lmo1999</i>	similar a glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase	1,82
<i>lmo1204</i>	similar a biossíntese de transportador de cobalto (CbiM)	1,80
<i>lmo2099</i>	similar ao antiterminador de transcrição (BglG)	1,80
<i>lmo2288</i>	proteína gp15 (Fago_Gp15)	1,79
<i>fxsA</i>	proteína de membrana FxsA	1,79
<i>lmo0669</i>	similar a oxidoreductase	1,78
<i>lmo2520</i>	similar a sintase MenC de <i>B. subtilis</i>	1,77
<i>lmo2687</i>	similar a proteína de divisão celular FtsW	1,77
<i>lmo2497</i>	similar ao transportador ABC de fosfato (PstA)	1,75
<i>folC</i>	similar a sintetase Folil-poliglutamato (FolC)	1,73
<i>inlH</i>	internalina H	1,72
<i>lmo2603</i>	proteína hipotética (FmdA)	1,72
<i>lmo0754</i>	similar a desidratase 7- α (NTF2)	1,71
<i>lmo2853</i>	similar a proteína Jag de <i>B. subtilis</i>	1,70
<i>lmo2674</i>	similar a ribose 5-fosfato epimerase (LacAB_rpiB)	1,70

continua

continuação

Gene	Descrição de acordo com o GeneBank	Fold change (S-M)*
<i>lmo0906</i>	similar a glutathione redutase	1,67
<i>lmo0689</i>	similar a proteína CheV	1,66
<i>lmo2172</i>	similar a propionato CoA-transferase (COG4670)	1,65
<i>lmo1500</i>	proteína hipotética DedA	1,64
<i>lmo2204</i>	proteína hipotética	1,64
<i>lmo0704</i>	proteína hipotética	1,64
zurM	proteína de transporte de zinco (transportador ABC)	1,62
<i>lmo2244</i>	similar a subunidade ribossomal (RluA)	1,62
<i>lmo0580</i>	similar a carboxilesterase	1,62
<i>lmo2663</i>	similar a poliol dehidrogenase (Tdh)	1,61
<i>lmo1271</i>	similar a peptidase sinalizadora I	1,61
<i>lmo0783</i>	similar ao sistema fosfotransferase manose-específico (PTS), IIB	1,60
<i>lmo0798</i>	similar a permease lisina-específica	1,59
<i>lmo2436</i>	similar ao antiterminador de transcrição	1,58
<i>lmo0584</i>	proteína hipotética	1,56
<i>lmo1341</i>	similar ao operon comGG de <i>B. subtilis</i>	1,56
<i>lmo2314</i>	proteína hipotética	1,56
<i>lmo0346</i>	similar a triosefosfato isomerase	1,55
<i>lmo2807</i>	proteína hipotética secretada	1,55
<i>hemE</i>	similar a uroporfirinogenio III decarboxilase	1,54
<i>bvrB</i>	enzima fosfotransferase beta-glucosideo-específico (componente ABC)	1,54
<i>hisE</i>	similar a fosforibosil-AMP-ciclohidrolase (proteína HisI2)	1,53
<i>lmo0483</i>	proteína hipotética	1,53
<i>lmo1063</i>	similar ao transportador ABC (SalX)	1,53
<i>argD</i>	similar a N-acetilornitina aminotransferase	1,52
<i>lmo2299</i>	proteína hipotética	1,51
<i>lmo2216</i>	similar a proteína histidina (HIT)	1,50

*Fold change = Razão de mudança entre a cepa selvagem e a mutante ($\Delta sigB$).

Vermelho – genes em destaque

Analisando-se os dados obtidos é possível verificar as contribuições às características de multiplicação σ^B -dependentes, sob condições de elevado estresse osmótico, indicando a importância de σ^B como um regulador de transcrição nessa espécie.

A diversidade de genes regulados por σ^B e encontrados, tanto neste estudo, quanto em outros descritos na literatura, pode refletir na forma como os diferentes sorotipos de *L. monocytogenes* respondem ao estresse ambiental. Assim, um dos temas mais estudados atualmente está relacionado à análise de genes diferencialmente expressos nas linhagens I e II de *L. monocytogenes*, quando submetidas a diferentes condições ambientais (SEVERINO et

al., 2007; OLIVER et al., 2010). A condição de elevado estresse osmótico e temperatura foi avaliada pela primeira vez neste estudo. A quantidade de genes diferencialmente expressos e nunca antes citados como positivamente regulados por σ^B indicam a complexidade e diversidade no comportamento de *L. monocytogenes*, sendo que estudos adicionais ainda serão necessários para elucidar completamente os mecanismos de adaptação e virulência deste micro-organismo em ambientes hostis.

A técnica de *microarray* fornece resultados muito dispersos sendo necessário o agrupamento dos genes diferencialmente expressos em categorias funcionais, para que uma análise mais ampla possa ser realizada. Assim, os genes diferencialmente expressos nas duas linhagens de *L. monocytogenes* foram agrupados de acordo com a classificação do J. Craig Venter Institute (JCVI).

Os resultados apresentados na Tabela 11 demonstram que, assim como a maioria dos estudos de *microarray*, uma grande parte dos genes diferencialmente expressos se enquadra nas categorias de “Desconhecida” ou “Proteínas hipotéticas”, indicando que embora tenham ocorrido avanços com relação aos projetos de análise do genoma e transcriptoma de *L. monocytogenes*, ainda há um longo caminho a se percorrer, principalmente com relação aos estudos de proteômica.

A presença de um número elevado de genes relacionados ao metabolismo e a resposta ao estresse era esperado, uma vez que é bem caracterizado o papel de σ^B em resposta a situações brandas de estresse. Também foi possível verificar a presença de genes relacionados direta (*inlA* e *inlB*) ou indiretamente (*zurM*) a virulência de *L. monocytogenes*. Corbett et al. (2012) verificaram que cepas de *L. monocytogenes* deficientes do gene *zurM* apresentaram virulência atenuada em células HeLa e também em modelos com camundongos. O resultado obtido no presente estudo, caracteriza pela primeira vez o gene *zurM* como regulado positivamente por σ^B , pois o mesmo não havia sido descrito dessa forma por outros trabalhos da literatura (Tabela 1 - Anexo).

Tabela 11. Genes regulados positivamente por σ^B de acordo com sua categoria funcional nas cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II quando cultivada em caldo BHI (*aw* 0,94) a 25°C

Categoria funcional	Quantidade de genes σ^B -dependentes (destacados)	
	Linhagem I	Linhagem II
Virulência	1 (<i>inlD</i>)	4 (<i>inlA</i> , <i>inlB</i> , <i>inlH</i> , <i>zurM</i>)
Resposta a estresse	3 (<i>csplA</i> , <i>lmo0903</i> , <i>lmo1601</i>)	1 (<i>lmo0669</i>)
Transporte	9 (<i>lmo0169</i> , <i>lmo1421</i> , <i>atpE</i>)	11 (<i>lmo1204</i> , <i>bvrB</i>)
Divisão celular	5 (<i>mraY</i> , <i>lmo1071</i>)	1 (<i>lmo2617</i>)
Metabolismo de DNA/RNA	17 (<i>rpoD</i> , <i>sigH</i> , <i>resD</i> , <i>pyrR</i>)	6 (<i>lmo2795</i> , <i>lmo1908</i>)
Metabolismo de proteínas	20 (<i>gadA</i> , <i>cysE</i> , <i>arcA</i>)	7 (<i>rpmJ</i> , <i>rplN</i>)
Metabolismo de carboidratos	11 (<i>lmo0781</i> , <i>lmo0782</i> , <i>glpK-2</i>)	4 (<i>lmo0782</i> , <i>lmo0783</i>)
Metabolismo de lipídeos	-	2 (<i>lmo0580</i>)
Processo metabólicos diversos	61 (<i>gabD</i> , <i>aroK</i> , <i>fhs</i> , <i>menD</i>)	10 (<i>folC</i> , <i>hemE</i>)
Proteínas hipotéticas	28	12
Desconhecida	18	10
TOTAL	173	68

Uma possível explicação para as diferenças encontradas nos perfis de expressão gênica, principalmente com relação ao número de genes diferencialmente expressos, entre as cepas X1-001 e J1-194 pode estar relacionada com suas origens. X1-001 é derivada da cepa 10403S, uma cepa de laboratório adaptada e utilizada ao longo dos anos em diversos estudos, enquanto J1-194 foi isolada recentemente a partir de uma amostra clínica.

Uma outra hipótese para explicar as diferenças de transcrição de genes σ^B -dependentes observadas entre as duas linhagens de *L. monocytogenes*, pode estar relacionada à presença de *single nucleotide polymorphism* (SNPs) nas regiões promotoras de σ^B . Esta hipótese sugere que a diversificação das sequências promotoras entre linhagens podem modular a transcrição de alguns genes σ^B -dependentes, afetando de modo diferente os sistemas de resposta ao estresse em cepas de *L. monocytogenes* (OLIVER et al., 2010).

Além disso, estudos comparativos de hibridização DNA/DNA utilizando *arrays* (CALL et al., 2003; ZHANG et al., 2003) revelaram diferenças com relação ao conteúdo gênico entre cepas de sorotipos e origens diferentes. Entretanto, também é necessário considerar que os diferentes padrões de virulência apresentados por cepas de *L. monocytogenes* podem ocorrer apenas devido a diferenças nos perfis de expressão gênica.

A RT-PCR foi utilizada para confirmar e validar os níveis de transcrição entre as cepas selvagens e suas mutantes $\Delta sigB$ para os genes *inlD*, *gltx*, *inlA*, *inlB* e *lmo0398* que

apresentaram expressão diferencial positiva e já haviam sido descritos como σ^B -dependentes (CHAN et al., 2007; MACGANN et al., 2008, OLLINGER et al., 2010; OLIVER et al., 2010), além do gene *fri* que apresentou expressão diferencial negativa.

Os resultados obtidos com a RT-PCR (Tabela 12) estiveram de acordo com aqueles obtidos com os ensaios de *microarray*. A RT-PCR (TaqMan) é considerada mais sensível que o *microarray* (OLIVER et al, 2010), o que justifica a obtenção de valores de *fold change* maiores nos ensaios TaqMan, apesar de todos confirmarem os resultados de expressão gênica diferencial obtidos no *microarray*.

Estudos anteriores (SUE et al., 2004; KIM et al., 2005), assim como os resultados obtidos com o *microarray* nesse estudo, demonstram que os genes de virulência *inlA* (InlA) e *inlB* (InlB) são σ^B -dependentes, entretanto, a condição de estresse osmótico utilizada neste estudo demonstrou que esses genes são diferencialmente expressos, principalmente, na linhagem II. O gene *inlD*, possivelmente relacionado à virulência de *L. monocytogenes*, também apresentou expressão diferencial positiva, porém na linhagem I (Tabela 12).

Os ensaios de RT-PCR confirmaram ainda que o gene *fri*, codificador de uma proteína de ligação a ferritina, apresenta regulação negativa em situações de estresse osmótico, assim como demonstrado por Chan et al. (2007), que realizou a mesma avaliação, entretanto em condições de temperatura reduzida. Fiorini et al. (2008) demonstraram que a expressão de *fri* está sob regulação de σ^A , principalmente com relação à fase de multiplicação que se encontra *L. monocytogenes*. Esses pesquisadores observaram ainda que *fri* também possui regulação negativa em ambientes com ferro em excesso, além de apresentar expressão máxima em fase exponencial de multiplicação.

Tabela 12. Genes regulados por σ^B , determinados por *microarray* e confirmados por RT-PCR *real time*, nas cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II quando cultivadas em caldo BHI (*aw* 0,94) a 25°C

Genes	<i>Fold change microarray (S-M)*</i>	<i>Fold change RT-PCR tempo real (S-M)</i>
<u><i>Linhagem I</i></u>		
<i>inlD</i>	8,07	12,6 ± 2,2
<i>fri</i>	-2,35	-2,00 ± 0,7
<i>gltx</i>	1,63	2,80 ± 1,8
<u><i>Linhagem II</i></u>		
<i>lmo0398</i>	1,96	2,41 ± 0,8
<i>inlA</i>	1,88	3,05 ± 1,2
<i>inlB</i>	1,91	5,53 ± 0,5

*Selvagem – Mutante ($\Delta sigB$); ($\pm$ desvio padrão)

Após a obtenção do perfil de expressão gênica para cada uma das linhagens de *L. monocytogenes*, foram selecionadas quatro cepas de cada um dos sorotipos 4b e 1/2a, mais a cepa Scott A, do total de 22 cepas de *L. monocytogenes* utilizadas neste estudo para confirmar se a expressão gênica diferencial observada para as cepas padrão se repetiria com cepas isoladas de alimentos e casos clínicos, submetidas às mesmas condições. Essa avaliação foi realizada através da determinação de *fold change* entre as cepas incubadas em caldo BHI (*aw* 0,99) e depois de submetidas ao estresse osmótico (BHI - *aw* 0,99) a 25°C.

Os resultados obtidos e apresentados na Tabela 13 demonstraram que para a linhagem II, todos os genes avaliados apresentaram expressão gênica diferencial depois de submetidas ao estresse osmótico a 25°C, embora, estatisticamente, essas diferenças não tenham sido comprovadas para o gene *inlB* (cepas 9a, 11a, 21a e 22a) e para os genes *inlA* e *lmo0398*, apenas para a cepa 22a. Resultados semelhantes podem ser observados para as cepas da linhagem I, quem também apresentaram expressão diferencial para praticamente todos os genes, porém apenas alguns deles comprovados estatisticamente.

Tabela 13. Genes regulados positivamente por σ^B nas cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II, cultivadas em caldo BHI (a_w 0,99) sob estresse osmótico (BHI a_w 0,94) a 25°C

Cepas	Origem*	Fold change RT-PCR Tempo Real (C-T)**					
		<i>lmo0398</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlD</i>	<i>fri</i>	<i>gltx</i>
9a	Alimentos	4,12 ± 1,6 ^a	2,25 ± 0,8 ^a	3,04 ± 0,8	-	-	-
11a	Alimentos	6,25 ± 1,6 ^a	8,42 ± 1,9 ^a	2,89 ± 0,8			
20a	Clínica	2,53 ± 2,0 ^a	4,27 ± 3,0 ^a	1,63 ± 1,0	-	-	-
22a	Clínica	0,89 ± 0,7	1,24 ± 0,7	3,02 ± 1,1	-	-	-
1b	Alimentos	-	-	-	6,56 ± 2,6 ^a	-1,08 ± 0,1	1,78 ± 0,9
6b	Alimentos	-	-	-	2,69 ± 0,9 ^a	0,58 ± 0,5	3,05 ± 1,8 ^a
8b	Clínica	-	-	-	0,96 ± 0,8	-3,02 ± 0,8 ^a	1,48 ± 0,5
14b	Clínica	-	-	-	5,36 ± 3,1 ^a	-2,04 ± 0,6	4,09 ± 3,2 ^a
Scott A	Clínica	2,06 ± 1,6	3,52 ± 0,9 ^a	2,89 ± 1,8	-	-	-

* Consultar Tabela 2 para origem de isolamento

** Controle (BHI a_w 0,99) – Teste (BHI a_w 0,94); (± desvio padrão)

^a p < 0,05

A expressão diferencial positiva de genes, principalmente aqueles relacionados à virulência (internalinas), é especialmente preocupante uma vez que estes resultados indicam que algumas cepas de *L. monocytogenes*, independentemente do sorotipo, podem se tornar mais virulentas quando submetidas às condições semelhantes àsquelas encontradas pelos micro-organismos na indústria de alimentos ou mesmo após a passagem pelo trato gastrointestinal de humanos e animais.

4.6 Avaliação da atividade hemolítica das cepas de *L. monocytogenes*

A capacidade hemolítica *in vitro* das cepas de *L. monocytogenes* foi medida através da lise e consequente liberação de hemoglobina das hemácias de carneiro, quando em contato com as cepas das linhagens I e II. As cepas testadas, independentemente da linhagem ou origem de isolamento, apresentaram fenótipo homogêneo, ou seja, demonstraram atividade hemolítica média de 22 UH (Tabela 14).

As exceções ao comportamento apresentado pela maioria das cepas de *L. monocytogenes* foram as cepas 17b, 13a e 21a que, assim como a cepa de *L. innocua*, apresentaram capacidade hemolítica reduzida, provavelmente devido a baixa expressão do gene *hly*.

Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) com relação ao potencial hemolítico das cepas entre as linhagens I e II de *L. monocytogenes*. Também não houve diferença ($p < 0,05$) entre os fenótipos observados e a origem de isolamento (clínicas ou alimentos).

Os resultados obtidos no ensaio de hemólise estão de acordo com dados de outros estudos, os quais não observaram diferenças significativas com relação à capacidade hemolítica das cepas das linhagens I e II (CHIU et al., 2006; CRUZ, 2007).

Tabela 14. Atividade hemolítica das cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de amostras clínicas e alimentos

Cepa	Sorotipo	Origem*	Unidade hemolítica
1b	4b	Alimentos	24,00
2b	4b	Alimentos	21,80
3b	4b	Alimentos	22,50
4b	4b	Alimentos	24,00
6b	4b	Alimentos	23,10
7b	4b	Alimentos	23,10
8b	4b	Clínica	24,20
12b	4b	Clínica	23,21
14b	4b	Clínica	23,40
16b	4b	Clínica	16,00
17b	4b	Clínica	< 1
18b	4b	Clínica	20,40
9a	1/2a	Alimentos	24,70
10a	1/2a	Alimentos	24,00
11a	1/2a	Alimentos	22,50
12a	1/2a	Alimentos	22,50
13a	1/2a	Clínica	< 2
15a	1/2a	Clínica	21,70
19a	1/2a	Clínica	23,10
20a	1/2a	Clínica	24,80
21a	1/2a	Clínica	< 1
22a	1/2a	Clínica	16,00
Scott A	4b	Clínica	16,00
LI	-	Ambiente	< 1

*Consultar Tabela 2 para fonte de isolamento / LI – *Listeria innocua*

Chiu et al. (2006) caracterizaram cepas de diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, isoladas de alimentos e amostras clínicas, quanto ao seu potencial patogênico, utilizando a capacidade hemolítica em meio de cultura como um dos parâmetros para tal avaliação. Interessantemente, assim como observados neste estudo (Tabela 14), a cepa Scott A, reconhecidamente patogênica, apresentou hemólise reduzida quando cultivada em ágar sangue de carneiro

O ensaio de hemólise também foi realizado com intuito de mensurar a atividade hemolítica de LLO com relação à dependência dos fatores de transcrição PrfA σ^B . A habilidade de lisar hemácias de carneiros foi comparada entre as cepas selvagens e mutantes.

Assim como observado para a maioria das 22 cepas de *L. monocytogenes*, as cepas selvagens J1-194 e X1-001 (Tabela 15) apresentaram capacidade hemolítica acentuada. Atividades hemolíticas reduzidas foram observadas apenas para os mutantes com deleção de *prfA*, consistente com a natureza PrfA-dependente dos transcritos de *hly* (LLO) (NADON et al., 2002; OLLINGER et al., 2009).

Já o fator σ^B , aparentemente não atua na regulação de *hly*, uma vez que os mutantes $\Delta sigB$ apresentaram fenótipo semelhante aos das cepas selvagens (Tabela 15). Esta observação corrobora os resultados obtidos no *microarray* (item 4.5), os quais não demonstraram expressão gênica diferencial do gene *hly* na ausência do fator σ^B .

Tabela 15. Atividade hemolítica das cepas de *L. monocytogenes* selvagens e suas respectivas mutantes.

Cepa	Sorotipo	Genótipo	Unidade Hemolítica
J1-194	1/2b	Selvagem	24,00
C6-001	1/2b	$\Delta sigB$	21,88
C6-004	1/2b	$\Delta prfA$	< 2
C6-005	1/2b	$\Delta sigB \Delta prfA$	< 2
X1-001	1/2a	Selvagem	21,40
A1-254	1/2a	$\Delta sigB$	16,00
B2-046	1/2a	$\Delta prfA$	< 2
B2-068	1/2a	$\Delta sigB \Delta prfA$	< 2

4.7 Avaliação da capacidade invasiva de *L. monocytogenes* em modelo de células epiteliais

As cepas de *L. monocytogenes* foram caracterizadas quanto a sua eficiência de invasão em células Caco-2, levando-se em conta apenas os micro-organismos que aderem à superfície da célula hospedeira, penetram no seu citoplasma e são posteriormente recuperados e enumerados depois da lise celular.

A média das eficiências de invasão (relativas à cepa controle X1-001) para os isolados de *L. monocytogenes* variaram de aproximadamente 10% a 320% (Figura 16). A análise de variância da capacidade invasiva demonstrou que cepas da linhagem I (sorotipo 4b) apresentam maior capacidade de invasão ($p < 0,05$) em relação às cepas da linhagem II (sorotipo 1/2a). Por outro lado, diferenças estatísticas não foram observadas ($p > 0,05$) com relação à origem de isolamento das cepas, ou seja, independentemente se isoladas a partir de alimentos ou amostras clínicas.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que não foi possível verificar uma relação entre a capacidade invasiva e a origem de isolamento das cepas, quando submetidas ao estresse osmótico. Todavia essa capacidade invasiva parece estar diretamente relacionada ao sorotipo (ou linhagens) de *L. monocytogenes*, ou seja, cepas 4b apresentam maior capacidade invasiva do que cepas 1/2a, independente da origem de isolamento. Observações semelhantes a essa já foram observadas outros estudos com diferentes linhagens de *Listeria monocytogenes* (JACQUET et al., 2004; NIGHTINGALE et al., 2008; VAN STELTEN et al., 2010).

As cepas de *L. monocytogenes* apresentaram variação considerável na habilidade em invadir células epiteliais humanas Caco-2, incluindo as cepas 17b, 20a, 21a, e 22a, cujo fenótipo de invasão foi reduzido, ou seja, a eficiência de invasão foi menor do que 20% (Figura 16). Este limite de 20% foi considerado devido a dados encontrados na literatura (FELICIO et al., 2007) que sugerem que apenas isolados com esse fenótipo apresentariam *premature stop codons* (PMSCs) no gene *inlA*, responsável pela transcrição de uma proteína essencial (InlA) para invasão em células epiteliais.

Esses fenótipos de invasão reduzidos parecem ocorrer devido a diferentes mecanismos, incluindo: (i) mutações nos PMSCs de *inlA*, gerando uma proteína InlA truncada e ineficiente; (ii) transcrição reduzida de *inlA*; e (iii) motilidade reduzida (FERREIRA et al., 2011).

Figura 16. Eficiência de invasão das cepas de *L. monocytogenes* isoladas a partir de alimentos e amostras clínicas em células Caco-2. (Verde – cepas linhagem I, Azul – cepas linhagem II, Vermelho – cepa de referência).

Os ensaios de invasão em células Caco-2 também foram realizados com intuito de verificar se a capacidade de invasão de *L. monocytogenes* se alteraria após o contato com situações de elevado estresse osmótico. Assim, as cepas de referência deste estudo (Scott A, J1-194 e X1-001) foram submetidas ao estresse osmótico em caldo BHI com a_w 0,94 por 30 minutos, sendo em seguida colocadas em contato com as células de Caco-2.

Os resultados apontados na Figura 17 demonstram que as três cepas tiveram eficiência de invasão aumentada depois de submetidas a situação de elevado estresse osmótico. Entretanto, diferenças significativas do ponto de vista estatístico só puderam ser confirmadas para as cepas X1-001 e Scott A. Também é possível verificar que assim como os resultados obtidos com as 22 cepas de *L. monocytogenes*, neste ensaio a cepa da linhagem I apresentou capacidade invasiva maior em relação a cepa da linhagem II, embora a cepa Scott A tenha se mostrado menos eficiente que as outras cepas.

Após o contato e adaptação ao meio com elevado teor de NaCl, foram detectados aumentos significativos, por exemplo, mais de 50% (X1-001, Figura 17) na eficiência de invasão das cepas linhagens I e II. Esses resultados estão de acordo com outros encontrados na literatura (SUE et al., 2004; GARNER et al., 2006; OLESEN et al., 2009) que também empregaram ambientes com elevado estresse osmótico. Entretanto, existem outros estudos (JENSEN et al., 2008; WERBROUCK et al., 2009) que indicaram que não é possível estabelecer uma correlação entre a exposição ao NaCl e o aumento na capacidade invasiva de *L. monocytogenes*, sendo necessário a avaliação de outros parâmetros que possam estar envolvidos nesse processo, como por exemplo, a influência da matriz alimentícia ou da passagem do micro-organismo pelo trato digestivo.

Figura 17. Eficiência de invasão em células Caco-2 de cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em condições normais e submetidas ao estresse osmótico (**Preto** – cepas cultivadas em BHI *aw* 0,99, **Vermelho** – cepas submetidas ao estresse osmótico, BHI *aw* 0,94). * ($p < 0,05$)

Os ensaios de invasão também tiveram a finalidade de avaliar o papel do fator σ^B na capacidade invasiva das duas linhagens de *L. monocytogenes*. Assim, na Figura 18 é possível observar que para ambas as linhagens, a cepa selvagem apresentou maior eficiência de invasão em relação à sua mutante isogênica $\Delta sigB$ ($p < 0,05$), confirmando que σ^B contribui

significativamente na invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes*, independente da linhagem a que representem (OLIVER et al., 2010).

Figura 18. Eficiência de invasão em células Caco-2 de cepas de *L. monocytogenes*, selvagens e mutantes $\Delta sigB$, cultivadas em condições normais (BHI aw 0,99). * ($p < 0,05$)

Os micro-organismos para sobreviverem à uma condição adversa devem se adaptar e alterar o seu metabolismo durante o processamento de alimentos ou passagem gastrointestinal. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram que cepas de *L. monocytogenes* conseguem modificar o seu metabolismo em resposta ao estresse osmótico,

alterando sua virulência. Assim, pode-se supor que as cepas que respondem de forma mais eficiente às alterações ambientais devem também ser mais virulentas (ROCHE et al., 2005).

Também foi possível verificar que tempos de exposição curtos a elevadas concentrações de NaCl são suficientes para a geração de respostas preocupantes com relação à capacidade de invasão de *L. monocytogenes*. Entretanto, é necessário cuidado na interpretação dos dados gerados, uma vez que a fase de multiplicação tem um impacto significativo sobre a capacidade de invasão pré e pós-estresse osmótico em *L. monocytogenes*, tornando difícil de prever o risco relacionado a uma cepa em particular (WALECKA et al, 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam, de uma forma geral, que as cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II conseguem se adaptar a condição de elevado estresse osmótico em diferentes temperaturas, entretanto, foram observados indícios de que cepas da linhagem I conseguem de adaptar de uma forma mais eficiente a estas condições, inclusive alterando sua virulência. Além disso, também foi possível comprovar que o fator σ^B contribui diretamente na modulação do metabolismo de ambas as linhagens com relação à adaptação a situações de estresse osmótico.

A crescente discussão em âmbito global com relação à redução ou não das concentrações de sal presentes nos alimentos é extremamente importante, uma vez que micro-organismos, tais como *Listeria monocytogenes*, conseguem se adaptar a presença de sal, além de aumentar sua virulência. Acordos recentes entre o Ministério da Saúde e Associação Brasileira da Indústrias de Alimentação (ABIA) estabelecem a redução gradual dos teores de sal em alguns alimentos visando o aumento da qualidade de vida dos brasileiros e a consequente redução nos índices de hipertensão. Todavia é necessário que outras medidas de controle de patógenos sejam avaliadas e implantadas, para que não aumente o risco de contaminação desses alimentos.

5. CONCLUSÕES

Os dados gerados no presente estudo através de abordagens fenotípicas e correlacionadas ao transcriptoma de *L. monocytogenes* demonstraram que:

- *Listeria monocytogenes* é capaz de se adaptar e sobreviver a situações de elevado estresse osmótico em diferentes temperaturas, independente da origem de isolamento. Entretanto, as cepas da linhagem I (sorotipo 4b) conseguem se adaptar melhor a essa condição a 10°C e 25°C.
- O fator de transcrição σ^B atua diretamente na modulação da transcrição gênica e consequente adaptação a condições de elevado estresse osmótico nas duas principais linhagens de *L. monocytogenes*; por outro lado, o fator PrfA parece não atuar nessa regulação.
- *Listeria monocytogenes* apresenta diferentes padrões de expressão gênica entre as linhagens I e II, quando submetidas a situações de elevado estresse osmótico em temperatura ambiente, sendo que cepas da linhagem I apresentam um número maior de genes diferencialmente expressos e regulados por σ^B em comparação à linhagem II, indicando que a capacidade de adaptação a ambientes hostis é mais eficiente para a primeira linhagem.
- Cepas de *L. monocytogenes* apresentam atividade hemolítica acentuada, embora não apresentem diferenças entre as diferentes linhagens estudadas com relação a esse potencial. Por outro lado, cepas de *L. monocytogenes* da linhagem I apresentam maior capacidade de invasão em células epiteliais do que a linhagem II, sendo essa característica acentuada após a exposição a situações de estresse osmótico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.35, n.3, p.183-189, 2003.
- TOLEDO-ARANA, A., DUSSURGET, O., NIKITAS, G., SESTO, N., GUET-REVILLET, H., BALESTRINO, D., LOH, E., GRIPENLAND, J., TIENSUU, T., VAITKEVICIUS, K., BARTHELEMY, M., VERGASSOLA, M., NAHORI, M.A., SOUBIGOU, G., RÉGNAULT, B., COPPÉE, J.Y., LECUIT, M., JOHANSSON, J., COSSART, P. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. **Nature**, v.18, n.459, p.950-6, 2009.
- AROUS, S.; DALET, K. and HECHARD, Y. Involvement of the mpo operon in resistance to class IIa bacteriocins in *Listeria monocytogenes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.238, n.1, p.137-141, 2004.
- BAKARDJIEV, A. I.; STACY, B. A.; FISHER, S. J.; PORTNOY, D. A. Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission. **Infection and Immunity**, v.72, n.1, p.489-497, 2004.
- BARANYI, J. and ROBERTS, T.A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.23, n.3-4, p.277-94, 1994.
- BARBOSA, W.B.; CABEDO, L.; WEDERQUIST, H.J.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Growth Variation Among Species and Strains of *Listeria* in Culture Broth. **Journal of Food Protection**, v.57, n.9, p.756-775, 1994.
- BEGOT, C.; LEBERT, I.; LEBERT, A. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. **Food Microbiology**, v.14, n.5, p.403-412, 1997.
- BECKER, L. A.; CETIN, M. S.; HUTKINS, R. W. and BENSON, A. K. Identification of the gene encoding the alternative sigma factor σ^B from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.17, p.4547-4554, 1998.
- BERGHOLZ, T.M.; DEN BAKKER, H.C.; FORTES, E.D.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. **Foodborne Pathogen Disease**, v.7, n.12, p.1537-49, 2010.
- BERGHOLZ, T.M.; BOWEN, B.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. *Listeria monocytogenes* shows temperature-dependent and -independent responses to salt stress, including responses that induce cross-protection against other stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.8, p.2602-12, 2012.
- BISCHOFF, M.; DUNMAN, P.; KORMANEC, J.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; MOUNTS, W.; BERGER-BÄCHI, B.; PROJAN, S. Microarray-based analysis of the *Staphylococcus aureus* sigmaB regulon. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.13, p.4085-99, 2004.
- BISHOP, D.K.; HINRICHS, D.J. Adoptive transfer of immunity to *Listeria monocytogenes*. The influence of in vitro stimulation on lymphocyte subset requirements. **Journal of Immunology**, v.139, n.6, p.2005-9, 1987.
- BUNCIC, S.; AVERY, S.M.; ROCOURT, J.; DIMITRIJEVIC, M. Can food-related environmental factors induce different behavior in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? **International Journal of Food Microbiology**, v.65, n.3, p.201-212, 2001.

- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, n.2, p.169-193, 2000.
- BUSTIN, S.A.; BENES, V.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR: a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.34, n.3, p.597-601, 2004.
- CALL, D.R.; BORUCKI, M.K.; BESSER, T.E. Mixed-genome microarrays reveal multiple serotype and lineage-specific differences among strains of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.632-9, 2003.
- CHAN, Y.C.; RAENGPRADUB, S.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Microarray-based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.20, p.6484-98, 2007.
- CHATTERJEE, S.S.; OTTEN, S.; HAIN, T.; LINGNAU, A.; CARL, U.D.; WEHLAND, J.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Invasiveness is a variable and heterogeneous phenotype in *Listeria monocytogenes* serotype strains. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, n.4-5, p.277-86, 2006.
- CHEN, Y.; ROSS, W.H.; GRAY, M.J.; WIEDMANN, M.; WHITING, R.C.; SCOTT, V.N. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. **Journal of Food Protection**, v.69, n.2, p.335-344, 2006.
- CHEROUTRE-VIALETTE, M.; LEBERT, I.; HEBRAUD, M.; LABADIE, J.; LEBERT, A. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.42, n.1-2, 71-77, 1998.
- CHIARINI, E. *Listeria monocytogenes* em matadouros de aves: marcadores sorológicos e genéticos no monitoramento de sua disseminação. 2007. 167p. **Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)** – Faculdade de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CHIRIFE, J. and RESNIK, S.L. Unsaturated solutions of sodium chloride as reference sources of water activity at various temperatures. **Journal of Food Sciences**, v.49, n.6, p.1486-1488, 1984.
- CHIU, S.; VANDERLINDE, P.B.; DYKES, G.A. A comparison of selected methods for measuring the virulence properties of *Listeria* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, n.4, p.301-7, 2006.
- CORBETT, D.; WANG, J.; SCHULER, S.; LOPEZ-CASTEJON, G.; GLENN, S.; BROUGH, D.; ANDREW, P.W.; CAVET, J.S.; ROBERTS, I.S. Two zinc uptake systems contribute to the full virulence of *Listeria monocytogenes* during growth in vitro and in vivo. **Infection and Immunity**, v.80, n.1, p.14-21, 2012.
- CRUZ, C.D. Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*, pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimentos, do ambiente de processamento e de amostra clínica. 2007. 165p. **Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)**- Faculdade de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bactéria to osmotic stress. **Microbiology Reviews**, v.53, n.1, p.121-147, 1989.
- DELGADO, A. R. Listeriosis in pregnancy. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v.53, n.3, p.255-259, 2008.
- DESMOND, E. Reducing salt: a challenge for meat industry. **Meat Sciences**, v.74, n.1, p.188-196, 2006.

- DIAS, D. A. M. Persistência de cepas de *Listeria monocytogenes* em linha de abate industrial de frango em um matadouro no estado de São Paulo. 2008. 158p. Dissertação (**Mestrado em Ciências dos Alimentos**) – Faculdade de Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- DENNY, J. and MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in European opportunity for improved European surveillance. **Euro Surveillance**, v.13, n.13, 2008.
- DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3819-22, 2004.
- DOYLE, M.E.; MAZZOTTA, A.S.; WANG, T.; WISEMAN, D.W.; SCOTT, V.N. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v.64, n.3, p.410-29, 2001.
- FALEIRO, M.L.; ANDREW, P.W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, n.2, p.207-16, 2003.
- FAO/WHO. Hazard characterization for pathogens in food and water: guidelines. **Microbiological risk assessment series. FAO/WHO**, 2003. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562374.pdf>. Acessado em: 01/10/2012.
- FARBER, J.M.; COATES, F.; DALEY, E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, n.3, p.103-105, 1992.
- FARBER, J.M. and PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.
- FOOD and DRUG ADMINISTRATION (FDA). Risk assessment /safety assessment - *Listeria monocytogenes* risk assessment: VII. Interpretation and conclusions, 2003. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/ucm185289.htm>. Acessado em 20/11/2011,
- FELICIO, M. T.; HOGG, T.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.; WIEDMANN, M.. Recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* contamination in alheiras represents considerable diversity, including virulence-attenuated isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.12, p.3887-3895, 2007.
- FERREIRA, V.; BARBOSA, J.; STASIEWICZ, M.; VONGKAMJAN, K.; MORENO-SWITT, A.; HOGG, T.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P.; WIEDMANN, M. Diverse geno- and phenotypes of persistent *Listeria monocytogenes* isolates from fermented meat sausage production facilities in Portugal. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.8, p.2701-15, 2011.
- FIORINI, F.; STEFANINI, S.; VALENTI, P.; CHIANCONE, E.; DE BIASE, D. Transcription of the *Listeria monocytogenes* *fri* gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator. **Gene**, v.410, n.1, p.113-21, 2008.
- FREITAG, N.E.; PORT, G.C. and MINER, M. D. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, n.9, p.623, 2009.
- GARNER, M.R.; NJAA, B.L.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. **Infection and Immunity**, v.74, n.2, p.876-86, 2006.
- GENTLEMAN, R.C.; CAREY, V.J.; BATES, D.M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A.J.; SAWITZKI,

- G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J.Y.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v.5, n.10, R80, 2004.
- GOLDFINE, H. and SHEN, H. *Listeria monocytogenes: pathogenesis and host response*. Springer, 2007.
- GOUNADAKI, A.S.; SKANDAMIS, P.N.; DROSINOS, E.H.; NYCHAS, G.J. Effect of packaging and storage temperature on the survival of *Listeria monocytogenes* inoculated postprocessing on sliced salami. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p.:2313-20, 2007.
- GRAVES, M.; HELSEL, L.O.; STEIGERWALT, A.G.; MOREY, R.E.; DANESHVAR, M.I.; ROOF, S.E.; ORSI, R.H.; FORTES, E.D.; MILILLO, S.R.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M.; SWAMINATHAN, B.; SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. isolated from the natural environment Finger Lakes National Forest. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, n.6, p.1280–1288, 2010.
- GRAY, M.; ZADOKS, R.; FORTES, E.; DOGAN, B.; CAI, S.; CHEN, Y.; SCOTT, V.; GOMBAS, D.; BOOR, K.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.10, p.5833-5841, 2004.
- GUTIERREZ, C.; ABEE, T.; BOOTH, I.R. . Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, n.2, p.233-44, 1995.
- HAIN, T.; HOSSAIN, H.; CHATTERJEE, S.S.; MACHATA, S.; VOLK, U.; WAGNER, S.; BRORS, B.; HAAS, S.; KUENNE, C.T.; BILLION, A.; OTTEN, S.; PANE-FARRE, J.; ENGELMANN, S.; CHAKRABORTY, T. Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e sigmaB regulon. **BMC Microbiology**, v.20(8), 2008.
- HANDA-MIYA, S.; KIMURA, B.; TAKAHASHI, H.; SATO, M.; ISHIKAWA, T.; IGARASHI, K.; FUGII, T. Nonsense-mutated *inlA* and *prfA* not widely distributed in *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat seafood products in Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, n.3, p.312–318, 2007.
- HANNA, S.E.; WANG, H.H. Assessment of Environmental Factors on *Listeria monocytogenes* Scott A *inlA* Gene Expression by Relative Quantitative Taqman Real-Time Reverse Transcriptase PCR. **Journal of Food Protection**, v.69, n.11, p.2754-2757, 2006.
- HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*. Relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.
- HOFER, E.; REIS, C.M.; HOFER, C.B. Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.32-7, 2006.
- HU, Y.; OLIVER, H.F.; RAENGPRADUB, S.; PALMER, M.E.; ORSI, R.H.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and SigmaB in *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.24, p.7981-91, 2007a.
- HU, Y.; RAENGPRADUB, S.; SCHWAB, U.; LOSS, C.; ORSI, R.H.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Phenotypic and transcriptomic analyses demonstrate interactions between the transcriptional

- regulators CtsR and Sigma B in *Listeria monocytogenes*. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.24, p.7967-80, 2007b.
- JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.616-22, 2002.
- JACQUET, C.; DOUMITH, M.; GORDON, J.I.; MARTIN, P.M.; COSSART, P.; LECUIT, M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Infection Disease**, v.189, n.11, p.2094-100, 2004.
- JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. 7th ed. New York: Springer Sciences & Business Media, 2005.
- JEFFERS, G.T.; BRUCE, J.L.; MCDONOUGH, P.L.; SCARLETT, J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. **Microbiology**, v.147, n.5, p.1095-104, 2001.
- JEMMI, T. and STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique Et Technique**, v.25, n.2, p.571-580, 2006.
- JENSEN, A.; THOMSEN, L.E.; JØRGENSEN, 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, n.3, p.254-61, 2008.
- JOSEPH, B.; PRZYBILLA, K.; STÜHLER, C.; SCHAUER, K.; SLAGHUIS, J.; FUCHS, T.M.; GOEBEL, W. Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. **Journal of Bacteriology**, v.188, n.2, p.556-68, 2006.
- JUNTILA, J.R.; NIEMELÄ, S.I.; HIRN, J. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, v.65, n.4, p.321-7, 1988.
- KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v.65, n.11, p.1811-1829, 2002.
- KESKINEN, L.A.; TODD, E.C.; RYSER, E.T. Impact of bacterial stress and biofilm-forming ability on transfer of surface-dried *Listeria monocytogenes* during slicing of delicatessen meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.127, n.3, p.298-304, 2008.
- KAZMIERCZAK, M.J.; MITHOE, S.C.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.19, p.5722-34, 2003.
- KIM, H.; MARQUIS, H.; BOOR, K.J. SigmaB contributes to *Listeria monocytogenes* invasion by controlling expression of inlA and inlB. **Microbiology**, v.151, n.10, p.3215-22, 2005.
- KOUTSOUMANIS, K.P.; KENDALL, P.A.; SOFOS, J.N. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.12, p.7514-6, 2003.
- LAHUERTA, A.; WESTRELL, T.; TAKKINEN, J.; BOELAERT, F.; RIZZI, V.; HELWIGH, B.; BORCK, B.; KORSGAARD, H.; AMMON, A.; MÄKELÄ, P. Zoonoses in the European Union:

- origin, distribution and dynamics - the EFSA-ECDC summary report 2009. **Euro Surveillance**, v.16, n.13, 2011.
- LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite por *L. monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.
- LECLERCQ, A.; CLERMONT, D.; BIZET, C.; GRIMONT, P.; LE FLÈCHE-MATÉOS, A.; ROCHE, S.; BUCHRIESER, C.; CADET-DANIEL, V.; LE MONNIER, A.; LECUIT, M.; ALLERBERGER, F. *Listeria rocourtiae* sp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.60, n.9, p.2210–2214, 2009.
- LECUIT, M., OHAYON, H.; BRAUN, L., MENGAUD, J., COSSART, P. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. **Infection and Immunity**, v.65, n.12, p.5309–5319, 1997.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v.9, n.10, p.1216-1225, 2007.
- LIANOU, A.; STOPFORTH, J.D.; YOON, Y.; WIEDMANN, M.; SOFOS, J.N. Growth and Stress Resistance Variation in Culture Broth among *Listeria monocytogenes* Strains of Various Serotypes and Origins. **Journal of Food Protection**, v.69, n.11, p.2640-2647, 2006.
- LIANOU, A. and SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2172-98, 2007.
- LIU, S.; GRAHAM, J.E.; BIGELOW, L.; MORSE, P.D.; WILKINSON, B. J. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p.1697–1705, 2002.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains. **FEMS Microbiology Letters**, v.243, n.2, p.373-378, 2005.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.; WIEDMANN, M.; GORSKI, L.; MANDRELL, R.; AINSWORTH, A.; AUSTIN, F. *Listeria monocytogenes* subgroups IIIA, IIIB, and IIIC delineate genetically distinct populations with varied pathogenic potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.11, p.4229-4233, 2006.
- LIU, D.; LAWRENCE, M.L.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Towards an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. **International Journal of Food Microbiology**, v.118, n.2, p.101-115, 2007.
- LÓPEZ, V.; SUÁREZ, M.; CHICO-CALERO, I.; NAVAS, J.; MARTÍNEZ-SUAREZ, J.V. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿Son todos los aislamientos igual de virulentos? **Revista Argentina de Microbiología**, v.38, n.4, p.224-234, 2006.
- MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, v.7, n.4, 187-193, 1996.
- MALAK, M.; VIVIER, A.; ANDRÉ, P.; DECALLONNE, J.; GILOT, P. RAPD analysis, serotyping, and esterase typing indicate that the population of *Listeria monocytogenes* strains recovered from cheese and from patients with listeriosis in Belgium are different. **Canadian Journal of Microbiology**, 47, n.9, p.883-887, 2001.

- MANDIN, P.; FSIHI, H.; DUSSURGET, O.; VERGASSOLA, M.; MILOHANIC, E.; TOLEDO-ARANA, A.; LASA, I.; JOHANSSON, J.; COSSART, P. VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. **Molecular Microbiology**, v.57, n.5, p.1367-80, 2005.
- MARQUES, E.G.M.L.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.2, p.287-292, 2007.
- MCGANN, P.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. The alternative sigma factor sigma B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.9, p.2919-30, 2007.
- MCGANN, P.; RAENGPRADUB, S.; IVANEK, R.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Differential regulation of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes by sigmaB and PrfA as revealed by subgenomic microarray analyses. **Foodborne Pathogen and Disease**, v.5, n.4, p.417-35, 2008.
- MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R.T.; SMERDON, W.J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.92, n.1, p.15-33, 2004.
- MILOHANIC, E.; GLASER, P.; COPPÉE, J.Y.; FRANGEUL, L.; VEGA, Y.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUNST, F.; COSSART, P.; BUCHRIESER, C. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. **Molecular Microbiology**, v.47, n.6, p.1613-25, 2003.
- NADON, C.A.; WOODWARD, D.L.; YOUNG, C.; RODGERS, F.G.; WIEDMANN, M. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2704–2707, 2001.
- NADON, C.A.; BOWEN, B.M.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Sigma B contributes to PrfA-mediated virulence in *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.70, n.7, p.3948-52, 2002.
- NIGHTINGALE, K. K.; SCHUKKEN, Y. H.; NIGHTINGALE, C. R.; FORTES, E. D.; HO, A. J.; HER, Z.; GROHN, Y. T.; MCDONOUGH P.L.; WIEDMANN, M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, n.8, p.4458-4467, 2004.
- NIGHTINGALE, K.K.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.16, p.5537–5551, 2005a.
- NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAM, K.; MARTIN, K. E.; YEUNG, M.; WIEDMANN, M. Selected *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in food show reduced invasion in human intestinal cells due to distinct nonsense mutations in *inlA* leading to expression of truncated and secreted internalin A. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8764–8772, 2005b.
- NIGHTINGALE, K.K.; FORTES, E.D.; HO, A.J.; SCHUKKEN, Y.H.; GROHN, Y.T.; WIEDMANN, M. Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.11, p.1808-1814, 2005c.
- NIGHTINGALE, K.K.; IVY, R.A.; HO, A.J.; FORTES, E.D.; NJAA, B.L.; PETERS, R.M.; WIEDMANN, M. *inlA* premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates

- from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.21, p.6570-83, 2008.
- NORTON, D.M.; SCARLETT, J.M.; HORTON, K.; SUE, D.; THIMOTHE, J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.646-653, 2001.
- OKADA, Y.; OKADA, N.; MAKINO, S.I.; ASAKURA, H.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. The sigma factor RpoN (Sigma 54) is involved in osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.263, n.1, p.54–60, 2006.
- OLESEN, I.; VOGENSEN, F.K.; JESPERSEN, L. Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. **Foodborne Pathogen and Disease**, v.6, n.6, p.669-80, 2009.
- OLIER, M.; PIERRE, F.; LEMAITRE, J. P.; DIVIES, C.; ROUSSET, A.; GUZZO, J. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. **Microbiology**, v.148, n.6, p.1855–1862, 2002.
- OLIVER, H.F.; ORSI, R.H.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. *Listeria monocytogenes* {sigma}B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.13, p.4216-32, 2010.
- OLLINGER, J.; BOWEN, B.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J.; BERGHOLZ, T.M. *Listeria monocytogenes* sigmaB modulates PrfA-mediated virulence factor expression. **Infection and Immunity**, v.77, n.5, p.2113-24, 2009.
- ORSI, R. H.; RIPOLL, D.; NIGHTINGALE, K. K.; WIEDMANN M. Evolution of *inlA* in lineage I and lineage II *Listeria monocytogenes* isolates from humans, animals, foods, and pristine environments. **Microbiology**, v.153, n.8, p.2666–2678, 2007.
- ORSI, R. H.; SUN, Q.; WIEDMANN, M. Genome-wide analyses reveal lineage specific contributions of positive selection and recombination to the evolution of *Listeria monocytogenes*. **BMC Evolutionary Biology**, v.8, p.233, 2008.
- ORSI, R.H.; DEN BAKKER, H.C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, v., p., 2010.
- PARISI, A.; LATORRE, L.; NORMANNO, G.; MICCOLUPO, A.; FRACCALVIERI, R.; LORUSSO, V.; SANTAGADA, G. Amplified Fragment Length Polymorphism and Multi-Locus Sequence Typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.101-8, 2010.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.45, 2001.
- PORTNOY, D. A.; JACKS, P. S.; HINRICHS, D. J. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, n.4, p.1459–1471, 1988.
- PORTNOY, D.A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W. COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.60, n.4, p.1263-1267, 1992.

- PRICE, C.W.; FAWCETT, P.; CÉRÉMONIE, H.; SU, N.; MURPHY, C.K.; YOUNGMAN, P. Genome-wide analysis of the general stress response in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v.41, n.4, p.757-74, 2001.
- RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.1, p.158-71, 2008.
- RAGON, M.; WIRTH, T.; HOLLANDT, F.; LAVENIR, R.; LECUIT, M.; LEMONNIER, A.; BRISSE, S. A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. **PLoS Pathogens**, v.9, n.4, 2008.
- RASMUSSEN, O.F.; SKOUBOE, P.; DONS, L.; ROSSEN, L.; OLSEN, J.E. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. **Microbiology**, v.141, p.2053–2061, 1995.
- REA, R. B.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.2717–2727, 2004.
- REIS, C.M.; BARBOSA, A.V.; RUSAK, L.A.; VALLIM, D.C.; HOFER, E. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.2, p.173-176, 2011.
- ROBERTS, A.; NIGHTINGALE, K.; JEFFERS, G.; FORTES, E.; KONGO, J.M.; WIEDMANN, M. Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. **Microbiology**, v.152, n.3, p.685–693, 2006.
- ROCHE, S.M.; GRACIEUX, P.; MILOHANIC, E.; ALBERT, I.; VIRLOGEUX-PAYANT, I.; TÉMOIN, S.; GRÉPINET, O.; KEROUANTON, A.; JACQUET, C.; COSSART, P.; VELGE, P. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.6039-48, 2005.
- ROGGA, K. J.; SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; KATSIARI, M.C.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M. G. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4°C and 12°C. **International Dairy Journal**, v.15, n.1, p.59-67, 2007.
- ROSA, G. Delineamento de experimentos em genética genômica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.211-218, 2007.
- ROUSSEAUX, S.; OLIER, M.; LAMAITRE, J. P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-restriction fragment polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2180–2185, 2004.
- RYSER, E.T. and MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Marcel Dekker, Inc. Nova York. 3ed., 2007.
- SAUDERS, B.; DURAK, M.; FORTES, E.; WINDHAM, K.; SCHUKKEN, Y.; LEMBO, A.; AKEY, B.; NIGHTINGALE, K.; WIEDMANN, M. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* from natural and urban environments. **Journal of Food Protection**, v.69, n.1, p.93-105, 2006.
- SEVERINO, P.; DUSSURGET, O.; VÊNCIO, R.Z.; DUMAS, E.; GARRIDO, P.; PADILLA, G.; PIVETEAU, P.; LEMAÎTRE, J.P.; KUNST, F.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals

- differences in virulence, cell wall, and stress response. **Applied Environmental Microbiology**, v.73, n.19, p.6078-88, 2007.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A.; ROY, S.L.; JONES, J.L.; GRIFFIN, P.M. Foodborne illness acquired in the United States - major pathogens. **Emerging Infection Disease**, v.17, p.7–15, 2011.
- SCHUCHAT, A.; LIZANO, C.; BROOME, C.V.; SWAMINATHAN, B.; KIM, C.; WINN, K. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. **Pediatric Infection Disease Journal**, v.10, n.3, p.183-9, 1991.
- SMYTH, G. K. and SPEED, T. Normalization of cDNA microarray data. **Methods**, v.31, p.265–273, 2003.
- SMYTH, G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v.3, n.3, p.1-29, 2004.
- SMYTH, G. K. Limma: linear models for microarray data. **Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor**. Springer, New York, NY, 2005.
- SWAMINATHAN, B. and GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, 1236-1243, 2007.
- SUE, D.; FINK, D.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. **Microbiology**, v.150, n.11, p.3843-55, 2004.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p.2731-9, 2011.
- TIGANITAS, A.; ZEAKI, N.; GOUNADAKI, A.S.; DROSINOS, E.H.; SKANDAMIS, P.N. Study of the effect of lethal and sublethal pH and a(w) stresses on the inactivation or growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **International Journal of Food Microbiology**, v.134, n.1-2, p.104-12, 2009.
- VAN STELTEN, A.; SIMPSON, J.M.; WARD, T.J.; NIGHTINGALE, K.K. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in inlA are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n.9, p.2783-90, 2010.
- VASSEUR, C.; BAVEREL, L.; HÉBRAUD, M.; LABADIE, J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n.3, p.469-476, 1999.
- VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.84-640, 2001.
- VIALETTE, M.; PINON, A.; CHASSEIGNAUX, E.; LANGE, M. Growths kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, n.2, 121-131, 2003.

- VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K.H., et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes** (2nd ed.). Springer, 2009.
- WAŁECKA, E.; MOLEND, J.; KARPÍŠKOVÁ, R.; BANIA, J. Effect of heat exposure on invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. **Foodborne Pathogen and Disease**, v.8, n.7, p.839-41, 2011
- WARD, T.J.; GORSKI, L.; BORUCKI, M.K.; MANDRELL, R.E.; HUTCHINS, J.; PUPEDIS, K. Intraspecific phylogeny and lineage group identification based on the *prfA* virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.186, n.15, p.4994–5002, 2004.
- WARD, T.J.; DUCEY, T.F.; USGAARD, T.; DUNN, K.A.; BIELAWSKI, J.P. Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied Environmental Microbiology**, v.74, n.24, p.7629-42, 2008.
- WERBROUCK, H.; BOTTELDOOM, N.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; COILLIE, E.V. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. **Journal of Microbiology Methods**, v.69, n.2, p.306-314, 2007.
- WIEDMANN, M.; ARVIK, T.; BRUCE, J.L.; NEUBAUER, J.; DEL PIERO, F.; SMITH, M.C.; HURLEY, J.; MOHAMMED, H.O.; BATT, C.A. Investigation of a listeriosis epizootic in sheep in New York state. **American Journal of Veterinary Research**, v.58, n.7, p.733-737, 1997.
- WIEDMANN, M.; ARVIC, T. J.; HURLEY, R. J.; BOOR, K.J. General stress transcription sigma B factor and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.4, p.3650–3656, 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Food safety and foodborne illness. Fact sheet n°237, 2007**. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Acessado em: 01/10/2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Interpretative summary. 2012**. Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf. Acessado em: 28/05/2012.
- ZHANG, C.; ZHANG, M.; JU, J.; NIETFELDT, J.; WISE, J.; TERRY, P.M.; OLSON, M.; KACHMAN, S.D.; WIEDMANN, M.; SAMADPOUR, M.; BENSON, A. K. Genome diversification in phylogenetic lineages I and II of *Listeria monocytogenes*: Identification of segments unique to lineage II populations. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.18, p.5573–5584, 2003.
- ZHANG, C.; NIETFELDT, J.; ZHANG, M.; BENSON, A. K. Functional consequences of genome evolution in *Listeria monocytogenes*: The *lmo0423* and *lmo0422* genes encode SigmaC and LstR, a lineage II-specific heat shock system. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.21, p.7243–7253, 2005.

ANEXOS

Tabela 1. Genes identificados e regulados positivamente por σ^B nas cepas de *L. monocytogenes* linhagens I e II deste estudo em comparação com outros estudos de expressão gênica global.

<i>Gene</i>	Operon*	Oliver^a et al.	Raengpradub^b et al.	Ollinger^c et al.	Hain^d et al.	Toledo-Arana^e et al.
<i>lmo0010</i>	4	-	-	-	-	-
<i>mvaD</i>	4	-	-	-	-	-
<i>rpsF</i>	9	X	-	-	-	-
<i>lmo0134</i>	21	X	X	X	X	X
<i>lmo0135</i>	22	X	-	-	-	-
<i>lmo0137</i>	22	-	X	-	-	-
<i>lmo0164</i>	24	-	-	-	-	-
<i>lmo0167</i>	24	-	-	-	-	-
<i>lmo0169</i>	25	X	X	X	X	X
<i>lmo0197</i>	30	-	-	-	-	-
<i>lmo0227</i>	37	-	-	-	-	-
<i>lysS</i>	37	-	-	-	-	-
<i>ispD</i>	39	-	-	-	-	-
<i>gltX</i>	39	-	-	-	-	-
<i>cysE</i>	40	-	-	-	-	-
<i>cysS</i>	40	X	-	-	-	-
<i>lmo0240</i>	40	-	-	X	-	-
<i>lmo0242</i>	40	-	-	-	-	-
<i>lmo0243</i>	40	-	-	-	-	-
<i>sigH</i>	40	-	-	-	-	-
<i>secE</i>	41	-	-	X	-	-
<i>lmo0279</i>	49	-	-	-	-	-
<i>lmo0303</i>	53	-	-	-	-	-
<i>lmo0346</i>	58	X	X	-	-	-
<i>lmo0370</i>	63	-	-	-	-	-
<i>lmo0388</i>	66	-	-	X	-	-
<i>lmo0398</i>	68	X	X	-	-	-
<i>lmo0407</i>	70	-	-	X	-	X
<i>inlA</i>	77	X	X	-	-	X
<i>inlB</i>	77	X	X	-	-	X
<i>lmo0450</i>	78	-	-	-	-	-
<i>lmo0528</i>	86	-	-	-	-	-
<i>lmo0529</i>	86	-	-	-	X	-
<i>lmo0531</i>	86	-	-	-	-	-
<i>lmo0555</i>	89	X	X	X	X	X
<i>hisE</i>	91	-	-	-	-	-
<i>lmo0580</i>	94	X	X	X	X	X

continuação

<i>Gene</i>	<i>Operon*</i>	<i>Oliver^a et al.</i>	<i>Raengpradub^b et al.</i>	<i>Ollinger^c et al.</i>	<i>Hain^d et al.</i>	<i>Toledo-Arana^e et al.</i>
<i>lmo0590</i>	95	X	X	-	X	-
<i>lmo0628</i>	103	X	X	X	-	X
<i>lmo0670</i>	109	X	X	X	X	X
<i>lmo0669</i>	109	X	X	X	X	X
<i>lmo0689</i>	111	-	-	-	-	-
<i>lmo0704</i>	112	-	-	-	-	-
<i>lmo0764</i>	121	-	-	-	-	-
<i>lmo0781</i>	123	X	X	X	X	X
<i>lmo0782</i>	123	X	X	X	X	X
<i>lmo0783</i>	124	X	X	X	X	X
<i>lmo0819</i>	128	X	-	X	X	-
<i>rsbW</i>	136	X	X	X	-	-
<i>lmo0907</i>	138	X	-	-	-	-
<i>lmo0906</i>	138	-	-	-	-	-
<i>lmo0931</i>	142	-	-	-	-	-
<i>lmo0963</i>	152	-	-	-	-	-
<i>lmo1020</i>	163	-	-	-	-	-
<i>lmo1021</i>	163	-	-	-	-	-
<i>lmo1023</i>	163	-	-	-	-	-
<i>lmo1027</i>	165	-	X	-	-	-
<i>lmo1065</i>	173	-	-	-	-	-
<i>pheS</i>	190	-	-	-	-	-
<i>lmo1226</i>	192	X	-	X	-	-
<i>lmo1239</i>	194	-	-	-	-	-
<i>lmo1271</i>	200	-	-	-	-	-
<i>proS</i>	209	-	-	-	-	-
<i>lmo1394</i>	226	X	-	-	-	-
<i>lmo1421</i>	232	X	X	-	X	X
<i>lmo1434</i>	236	-	-	X	-	-
<i>dapA</i>	236	-	-	X	-	-
<i>zurM</i>	238	-	-	-	-	-
<i>recJ</i>	254	-	-	-	-	-
<i>glpK-2</i>	258	X	-	X	-	X
<i>lmo1541</i>	259	-	-	-	-	-
<i>folC</i>	262	-	-	-	-	-
<i>fxsA</i>	265	-	-	-	-	-
<i>argD</i>	270	-	-	-	-	-
<i>lmo1601</i>	272	X	X	X	X	X
<i>lmo1602</i>	272	X	X	X	X	X
<i>trmB</i>	275	-	-	-	-	-
<i>lmo1649</i>	284	-	-	-	-	-
<i>menD</i>	289	X	-	-	-	-
<i>lmo1708</i>	297	X	-	X	-	-
<i>lmo1751</i>	307	-	-	-	-	-

continuação

<i>Gene</i>	<i>Operon*</i>	<i>Oliver^a et al.</i>	<i>Raengpradub^b et al.</i>	<i>Ollinger^c et al.</i>	<i>Hain^d et al.</i>	<i>Toledo-Arana^e et al.</i>
<i>rplT</i>	312	-	-	-	-	-
<i>lmo1790</i>	313	X	-	-	-	X
<i>pyrR</i>	324	-	-	-	-	-
<i>mgsA</i>	342	-	-	-	-	-
<i>lmo1908</i>	342	X	-	-	-	-
<i>hepB</i>	347	X	-	X	-	-
<i>folE</i>	347	X	X	X	-	-
<i>resD</i>	351	-	-	-	-	-
<i>lmo1999</i>	361	X	-	-	-	X
<i>lmo2017</i>	364	-	-	-	-	-
<i>dapF</i>	364	-	-	X	-	-
<i>lmo2031</i>	366	X	-	X	-	-
<i>ftsA</i>	366	X	-	X	-	-
<i>mraY</i>	367	-	-	-	-	-
<i>ftsL</i>	368	X	-	X	-	-
<i>lmo2045</i>	369	-	-	-	-	-
<i>lmo2060</i>	373	-	-	-	-	-
<i>lmo2114</i>	387	-	-	-	-	-
<i>lmo2119</i>	388	-	-	-	-	-
<i>nrdA</i>	392	-	-	-	-	-
<i>lmo2163</i>	393	X	X	-	-	-
<i>lmo2217</i>	404	X	-	-	-	-
<i>lmo2216</i>	404	X	-	-	-	-
<i>lmo2244</i>	409	-	-	-	-	-
<i>lmo2269</i>	413	X	X	X	-	-
<i>lmo2266</i>	413	-	-	-	-	-
<i>lmo2288</i>	415	-	-	-	-	-
<i>lmo2299</i>	415	-	-	-	-	-
<i>lmo2371</i>	424	-	-	-	-	-
<i>lmo2399</i>	428	X	-	-	-	-
<i>lmo2449</i>	434	-	-	-	-	-
<i>lmo2454</i>	434	-	X	X	-	X
<i>lmo2490</i>	443	-	-	-	-	-
<i>lmo2520</i>	450	-	-	-	-	-
<i>atpE</i>	452	-	-	-	-	-
<i>upp</i>	453	-	-	-	-	-
<i>thrB</i>	456	-	-	-	-	-
<i>hom</i>	456	X	-	-	-	-
<i>lmo2602</i>	469	X	X	X	X	X
<i>lmo2603</i>	469	X	X	X	X	X
<i>rpsK</i>	470	-	-	-	-	-
<i>adk</i>	470	X	-	X	-	-
<i>rpmJ</i>	470	-	-	-	-	-
<i>rplN</i>	470	-	-	-	-	-

continuação

<i>Gene</i>	Operon*	Oliver^a et al.	Raengpradub^b et al.	Ollinger^c et al.	Hain^d et al.	Toledo-Arana^e et al.
<i>lmo2634</i>	471	-	-	-	-	-
<i>lmo2663</i>	477	X	-	-	-	-
<i>lmo2671</i>	478	X	X	X	X	X
<i>lmo2674</i>	479	X	X	X	X	X
<i>lmo2687</i>	483	-	-	-	-	-
<i>lmo2746</i>	498	-	-	-	-	-
<i>lmo2831</i>	514	-	-	-	-	-
<i>lmo0019</i>	NI**	X	X	X	X	X
<i>arcA</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0051</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0132</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0186</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0209</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>ldh</i>	NI	X	X	X	-	-
<i>cysK</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0272</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0394</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0415</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>rpmF</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0539</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0596</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0602</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0610</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0626</i>	NI	X	-	-	-	X
<i>lmo0642</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo0652</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0653</i>	NI	-	X	-	-	-
<i>lmo0655</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>lmo0722</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>glmS</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0731</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0787</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0796</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>scrK</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0871</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo0903</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>gabD</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0928</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo0929</i>	NI	X	-	-	-	X
<i>lmo1068</i>	NI	X	-	-	X	X
<i>lmo1071</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1140</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo1241</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>rpsO</i>	NI	-	-	-	-	-

continuação

<i>Gene</i>	<i>Operon*</i>	<i>Oliver^a et al.</i>	<i>Raengpradub^b et al.</i>	<i>Ollinger^c et al.</i>	<i>Hain^d et al.</i>	<i>Toledo-Arana^e et al.</i>
<i>cspL</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1375</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>gnd</i>	NI	X	-	X	-	-
<i>lmo1399</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>rpoD</i>	NI	X	-	X	-	-
<i>pfk</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>ald</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1670</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>aroK</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>pyn</i>	NI	X	X	-	-	-
<i>rpmF</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>ctaA</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo2132</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>lmo2174</i>	NI	-	-	-	-	X
<i>lmo2231</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo2232</i>	NI	X	X	X	-	-
<i>lmo2256</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2385</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2389</i>	NI	X	-	X	-	-
<i>lmo2390</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2391</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>gadG</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>lmo2494</i>	NI	-	X	X	X	X
<i>glyA</i>	NI	X	-	X	-	-
<i>fba</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2638</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo2690</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2740</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>guaB</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo2759</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>ychF</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>rpmH</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>inlD</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>LMOj2365_0800</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>LMOj2365_1681</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>fhs</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>LMOj6854_0989</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>nagB</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>LMOh7858_2006</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>inlH</i>	NI	-	X	X	X	X
<i>lmo0321</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>lmo0483</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0515</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo0524</i>	NI	X	-	X	-	X

continuação

<i>Gene</i>	Operon*	Oliver^a et al.	Raengpradub^b et al.	Ollinger^c et al.	Hain^d et al.	Toledo-Arana^e et al.
<i>lmo0584</i>	NI	X	-	-	-	X
<i>lmo0754</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0798</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo0953</i>	NI	X	X	X	X	-
<i>lmo1063</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1204</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1341</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo1500</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2099</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2172</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2204</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2212</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2213</i>	NI	X	X	X	-	X
<i>lmo2230</i>	NI	X	X	X	X	X
<i>lmo2314</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2436</i>	NI	X	-	-	-	-
<i>lmo2479</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2497</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2594</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2711</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>bvrB</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2795</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2807</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2853</i>	NI	-	-	-	-	-
<i>lmo2857</i>	NI	-	-	-	-	-

*Operons de acordo com a classificação de Arana-Toledo et al. (2009)

**Não identificados de acordo com a classificação de Arana-Toledo et al. (2009)

Vermelho - genes pela primeira vez descritos como σ^B -dependentes^a"X" representa os genes regulados positivamente por σ^B em *L. monocytogenes* 10403S (sorotipo 1/2a) em Raengpradub et al. (2008) e neste estudo^b"X" representa os genes regulados positivamente por σ^B em *L. monocytogenes* 10403S (sorotipo 1/2a) em Ollinger et al. (2008) e neste estudo^c"X" representa os genes regulados positivamente por σ^B em *L. monocytogenes* EGD-e (sorotipo 1/2a) em Hain et al. (2008) e neste estudo^d"X" representa os genes regulados positivamente por σ^B em *L. monocytogenes* (linhagens I, II, IIIA e IIIB) em Oliver et al. (2010) e neste estudo^e"X" representa os genes regulados positivamente por σ^B em *L. monocytogenes* EGD-e (sorotipo 1/2a) em Arana-Toledo et al. (2009) e neste estudo