



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Ciências Agrárias

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Listeria*
monocytogenes ser. 4b POR *AMPLIFIED FRAGMENT*
LENGTH POLYMORPHISM "AFLP"**

TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA

Maria Manuela Martins Francisco Goulão

Angra do Heroísmo

2010



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Ciências Agrárias

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Listeria*
monocytogenes ser. 4b POR AMPLIFIED FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM “AFLP”**

TESE DE MESTRADO EM ENGENHARIA ZOOTÉCNICA

Orientador: Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira
Co-orientador: Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Maria Manuela Martins Francisco Goulão

Angra do Heroísmo

2010

Aos meus filhos,
Gonçalo e Francisco

**“As doutrinas expressas neste trabalho
são da inteira responsabilidade do seu autor”**

Este trabalho foi realizado na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, nos Laboratórios de Microbiologia e Biologia, sob a orientação das Professoras Cristina Maria Baptista Santos Pintado e Maria Adélia da Silva Santos Ferreira.

Agradecimentos

Terminado este trabalho, gostaria de manifestar o meu reconhecimento a todas as pessoas que de uma forma ou de outra contribuíram para a sua concretização.

À Professora Doutora Adélia Ferreira por ter aceite orientar este trabalho e por toda a sua disponibilidade.

À Professora Doutora Cristina Pintado por me ter sugerido e incentivado à realização deste trabalho, como co-orientadora desempenhou um papel primordial, na cedência de informação, saber, experiência e amizade.

Ao Professor Carlos Reis pelos preciosos ensinamentos, pela disponibilidade no decorrer da realização da parte experimental do trabalho e pela sua dedicação.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco, por todos os meios disponibilizados e condições necessárias à realização deste trabalho.

À minha colega e querida amiga Lena por me “aturar” e aliviar de algumas tarefas no laboratório para que assim pudesse levar a cabo este trabalho.

À Gracinha por me ter acolhido tão bem no “seu” laboratório de Biologia.

À Natália pelo seu apoio fotográfico, arranjo de imagens e por toda a sua disponibilidade.

À São no incentivo e ajuda da tradução do manual Quantity One.

Ao professor Doutor João Pedro Luz, pelo seu interesse e pela amabilidade ao ter proporcionado a aquisição do programa Quantity One.

Ao Eng^o Jorge Matos, Healthcare Scientist Specialist, in the Health Protection Agency, (Gastrointestinal, Emerging and Zoonotic Infections Department, Foodborne Pathogens Reference Unit, London – United Kingdom), pela sua preciosa ajuda na classificação dos perfis AFLP e dendrogramas obtidos neste trabalho.

À Eng^a Carla Maia, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), pelo apoio prestado na realização dos dendrogramas e por toda a sua disponibilidade.

À minha mãe pelo seu carinho e apoio incondicional que sempre me manifestou. À memória de meu pai que estará sempre no meu coração.

Finalmente, ao Zé, aos meus filhos, meus amores, pelo carinho e compreensão por todo o tempo em que estive menos presente. Eternamente agradecida.

BEM – HAJAM a todos

Resumo

O serotipo maioritariamente associado às estirpes de *Listeria monocytogenes* isoladas de queijos Portugueses pertence ao serotipo 4b, o qual está referido na literatura como o responsável pelo maior número de casos de listeriose humana. Tendo em conta a importância de que se revestem estas estirpes, a sua caracterização usando métodos mais discriminatórios que a serotipagem é de crucial importância. Assim, o presente estudo teve por finalidade a caracterização molecular de estirpes de *L. monocytogenes* ser. 4b, isoladas de queijos de diferentes zonas do país, e uma primeira avaliação da distribuição geográfica dos tipos moleculares encontrados.

Foi usado o método *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) com base no protocolo que se encontra em funcionamento no *Health Protection Agency Department of Gastrointestinal Infections / Centre for Infections*, em Londres. Para a análise da similaridade entre estirpes recorreu-se ao programa *Bionumerics*. O poder discriminatório do método AFLP foi calculado através do índice de diversidade de Simpson.

Das 47 estirpes de *L. monocytogenes* ser. 4b tipadas neste trabalho resultaram 6 perfis diferentes com um número de bandas compreendido entre 5 a 7 no intervalo entre 500 bp e 1500 bp. Todos os perfis AFLP apresentaram uma banda comum de aproximadamente 850 bp. O poder discriminatório do método AFLP foi avaliado em 0,70. Pela análise do dendrograma observou-se a existência de 6 *clusters* para uma percentagem de similaridade de 98%, os quais foram agrupados de acordo com o tipo AFLP previamente atribuído. A relação de similaridade mais afastada encontrada entre os 47 isolados foi de 67%. Considerando a totalidade dos isolados provenientes da região da Serra da Estrela, foi possível identificar 5 tipos AFLP, quatro dos quais identificados apenas naquela zona e um quinto tipo AFLP com uma distribuição geográfica alargada (Serra da Estrela, Serpa

e São Jorge), o que contraria a sua utilização como marcador geográfico. Comparando estes 47 perfis com os obtidos anteriormente pelo mesmo método usando isolados provenientes das zonas produtoras de queijo de Castelo Branco e Tolosa (n=61), concluiu-se que os tipos AFLP obtidos são diferentes, não havendo tipos AFLP comuns entre as zonas de Tolosa, Castelo Branco e Serra da Estrela, indicando uma associação entre um determinado tipo AFLP de *L. monocytogenes* ser. 4b e cada uma destas regiões.

Palavras-Chave: *Listeria monocytogenes* ser. 4b, tipagem por AFLP, marcadores geográficos, queijos

Abstract

The serotype more frequently associated with *Listeria monocytogenes* strains isolated from Portuguese cheeses belongs to serotype 4b, which is reported as responsible for the largest number of human listerioses outbreaks. Given the importance of these strains, their characterization by more discriminatory methods than serotyping is of crucial importance. Thus, the aim of the present study was the molecular characterization of strains of *L. monocytogenes* ser. 4b, isolated from cheese from different parts of the country, and the assessment of the geographical distribution of molecular types found.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) method was used based onto a protocol that is in operation at the Health Protection Agency Department of Gastrointestinal Infections / Centre for Infections in London. Cluster analysis was performed using the Bionumerics software. The discriminatory power of AFLP method was calculated using the Simpson diversity index.

The 47 strains of *L. monocytogenes* ser. 4b typed in this work resulted in six different profiles with 5-7 bands in the range between 500 bp and 1500 bp. All AFLP profiles showed a common band of about 850 bp. The discriminatory power of AFLP method was calculated in 0.70. The analysis of the dendrogram showed the existence of six clusters for a percentage of similarity of 98%, which were grouped according to the AFLP previously assigned. The similarity relation farthest found among 47 isolates was 67%. Considering all of the isolates from *Serra da Estrela*, it was possible to identify five types AFLP, four of them identified only in that area and a fifth AFLP with a wide geographical distribution (*Serra da Estrela*, *Serpa* and *São Jorge*), which dissuaded its use as a geographic marker. Comparing these 47 profiles with those obtained previously by the same method and isolated from cheese production areas of *Castelo Branco* and *Tolosa*

(n = 61), we conclude that the obtained AFLP types are different, with no common AFLP types among the areas of *Tolosa*, *Castelo Branco* and *Serra da Estrela*, indicating an association between a particular AFLP type of *L. monocytogenes* ser. 4b and each one of these regions of cheese production.

Keywords: *Listeria monocytogenes* ser. 4b, AFLP typing, geographical marker, cheeses

ÍNDICE

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	V
Índice	VII
Índice de Figuras	X
Índice de Quadros	XII
Lista de Abreviaturas	XIII

I. INTRODUÇÃO GERAL 1

1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.1 História	1
1.2 Taxonomia	1
1.3 Morfologia	3
1.4 Características culturais e bioquímicas	4
1.5 Características ecológicas e fisiológicas	5
1.5.1 Temperatura	5
1.5.2 Concentração de sal (NaCl)	6
1.5.3 Concentração hidrogeniônica (pH)	7
1.5.4 Actividade da água (a_w)	8
2. Listeriose	9
2.1 Características da doença	9
2.2 Virulência – serotipos implicados em listeriose	11
2.3 Dose infecciosa	15
2.4 Listeriose em Portugal	16
2.5 Surto de listeriose associados ao consumo de produtos lácteos	18
3. Fontes de contaminação de alimentos por <i>L. monocytogenes</i>	19
3.1 Existência no meio ambiente	19
3.2 Presença nas unidades fabris processadoras de alimentos	19
3.3 Ocorrência em alimentos	21

3.3.1 Leite e Produtos lácteos	22
3.3.1.1 Queijo	23
4. Métodos de tipagem usados na caracterização de <i>L. monocytogenes</i>	27
4.1 Métodos fenotípicos	28
4.1.1 Serotipagem	29
4.1.2 Fagotipagem	30
4.2 Métodos genotípicos	30
4.2.1 <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> - AFLP	32
4.2.1.1 Princípio do método AFLP	33
4.2.1.2 Modificações do método original AFLP	34
4.2.2 Comparação do AFLP com outros métodos utilizados na tipagem de <i>L. monocytogenes</i>	40
5. Enquadramento geral e objectivos	42
II. MATERIAL e MÉTODOS	44
1. Isolados bacterianos	44
2. Confirmação da pureza e características culturais dos isolados	46
3. Extracção de DNA	47
4. Método <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> – AFLP	49
4.1 Digestão de DNA com <i>Eco</i> RI e ligação dos adaptadores	51
4.2 Amplificação dos fragmentos de restrição por Reacção de Polimerização em Cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i> – PCR)	53
4.3 Electroforese dos fragmentos amplificados em gel de agarose	54
III. RESULTADOS e DISCUSSÃO	58
1. Confirmação da pureza e verificação das características culturais	58
2. Optimização do método AFLP	59
3. Avaliação da reprodutibilidade do método AFLP	61
3.1 Reprodutibilidade interlaboratorial	61
3.2 Reprodutibilidade intralaboratorial	63
4. Análise e identificação dos perfis AFLP de isolados de <i>L. monocytogenes</i> ser. 4b	64

5. Correlação entre o perfil AFLP e a origem geográfica dos isolados de *L. monocytogenes* serotipo 4b 68

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS 73

BIBLIOGRAFIA 75

ANEXOS

ANEXO I - Extração de DNA bacteriano

ANEXO II - Preparação dos Adaptadores *Eco* AD1 , *Eco* AD2 e *Primer Eco* RIG

ANEXO III - Preparação da solução tampão TAE 1x

ANEXO IV - Preparação do Gel de Agarose

ANEXO V - Preparação do Marcador

ANEXO VI - Preparação do Brometo de etídio (et Br)

Índice de Figuras

Figura 1 -	Chave de datas e acontecimentos e respectivas áreas de investigação relacionadas com <i>Listeria</i> desde a sua descoberta em 1926	3
Figura 2 -	Taxas de notificação de casos confirmados de listeriose humana na UE, 2004-2008	11
Figura 3 -	Capacidade discriminatória de diferentes métodos de tipagem genética de microrganismos	31
Figura 4 -	Esquema que resume as quatro etapas do método AFLP	34
Figura 5 -	Esquema representativo do método AFLP com a enzima de restrição <i>Eco</i> RI usada na tipagem de <i>L. monocytogenes</i>	36
Figura 6 -	Comportamento característico de alguns isolados de <i>L. monocytogenes</i> em meio selectivo OAA	46
Figura 7 -	Reacção de β - hemólise de alguns isolados de <i>L. monocytogenes</i> no meio de cultura Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro	46
Figura 8 -	Kit de extração de DNA , <i>Mo Bio UltraClean Microbial DNA isolation - DiversiLab™</i>	47
Figura 9 -	Fluxograma da metodologia para aplicação do método AFLP	50
Figura 10 -	Termociclador Biometra, <i>Tgradient</i>	52
Figura 11 -	Deposição do gel no tabuleiro da tina de electroforese	54
Figura 12 -	Carregamento das amostras no gel	55
Figura 13 -	Tina de electroforese ligada à fonte de alimentação – “Corrida de Electroforese”	55
Figura 14 -	Transiluminador (<i>UViTEC</i>) com sistema de captação de imagem e Gel Sujeito a radiação UV	56
Figura 15 -	Perfis AFLP de estirpes de <i>L. monocytogenes</i> tipadas nos laboratórios do INSA – Lisboa (usadas na implementação do método AFLP)	62
Figura 16 -	Perfis AFLP de estirpes de <i>L. monocytogenes</i> tipadas nos laboratórios da ESACB - Castelo Branco (usadas na optimização do método AFLP)	62
Figura 17 -	Dendrograma resultante da análise por AFLP, da estirpe de <i>Listeria monocytogenes</i> 3001 (NCTC 11994), obtida em diferentes electroforeses Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente Dice e com uma posição máxima de tolerância de 2.0%	63

Figura 18 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo de ovelha curado da região da Serra de Estrela. (GEL -1)	64
Figura 19 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo de ovelha curado da região da Serra de Estrela. (GEL - 2)	65
Figura 20 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo de ovelha curado da região da Serra de Estrela. (GEL - 3)	65
Figura 21 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo de ovelha curado da região da Serra de Estrela. (GEL - 4)	66
Figura 22 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo de ovelha das Regiões da Serra de Estrela e Serpa e de queijo curado de vaca da região de São Jorge (Açores). (GEL- 5)	66
Figura 23 - Dendrograma mostrando a matriz de similaridade entre todas as estirpes de <i>L. monocytogenes</i> estudadas pela análise AFLP. Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente <i>Dice</i> , de padrões AFLP, com uma posição máxima tolerância de 2.0%	70

Índice de Quadros

Quadro 1 - Listeriose em Portugal: 1994–2003	17
Quadro 2 - Surtos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos	18
Quadro 3 - Ocorrência de <i>Listeria monocytogenes</i> em leite e produtos lácteos	23
Quadro 4 - <i>L. monocytogenes</i> em queijos de pasta mole e semi-mole feitos a partir de leite cru e tratado termicamente a baixa temperatura, 2008	25
Quadro 5 - Serotipos associados a diferentes espécies de <i>Listeria</i>	30
Quadro 6 - Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> provenientes de queijos de ovelha (das regiões da Serra da Estrela e Serpa) e de vaca (da região de São Jorge, Açores) elaborados com leite cru	45
Quadro 7 - Sequência de nucleótidos dos adaptadores e <i>primer</i> usados no método AFLP	51
Quadro 8 - Constituição do <i>Mastermix</i>	51
Quadro 9 - Constituição da Mistura PCR	53
Quadro 10 - Resumo das etapas que ocorrem no termociclador na fase de amplificação	54
Quadro 11 - Estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> usadas para testar a reprodutibilidade interlaboratorial do método AFLP	61
Quadro 12 - Perfis - AFLP de todos os isolados testados e percentagem de cada perfil dentro dos 47 isolados de <i>L. monocytogenes</i>	67
Quadro 13 - Distribuição dos perfis AFLP de <i>Listeria monocytogenes</i> de acordo com a sua origem e data de isolamento	68

Lista de Abreviaturas

AFLP -	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ATCC -	<i>American Type Culture Collectio</i>
a_w -	Actividade da água
bp -	<i>Bases pair</i>
CE -	Comissão Europeia
CEE -	Comunidade Económica Europeia
DNA -	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECDC -	<i>European Centre for Disease Control and Prevention</i>
EFSA -	<i>European Food Safety Authority</i>
EM -	Estado Membro
ESACB -	Escola Superior Agrária de Castelo Branco
G+C -	Guanina + Citosina
g -	Grama
g -	Unidade de Medida da Força Centrifuga
HACCP -	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
HPA -	<i>Health Protection Agency</i>
H₂S -	Sulfureto de hidrogénio
INSA -	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
MEE -	<i>Multilocus Enzyme Electrophoresis</i>
ng -	Nanograma
OAA -	Ottaviani & Agosti Agar
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	<i>Polymerase Chain Reac</i>
PFGE -	<i>Pulse- Field Gel Electrophoresis</i>
pg -	Picograma
pH -	Potencial hidrogeniónico
RAPD -	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
REA -	<i>Restriction Endonuclease Analysis</i>
RFLP -	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rpm -	Rotações por minuto
rRNA -	<i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
TAE -	Tampão Tris, ácido acético e EDTA
TSA -	<i>Tryptone Soya Agar</i>

EU -	União Europeia
UFC -	Unidades Formadoras de Colónias
UPGMA -	<i>Unweighted Pair Group with Arithmetic Means</i>
UV -	Ultra Violeta
V -	Volt
VM -	Vermelho de metilo
VP -	Voges- Proskauer
µl -	Microlitro

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. *Listeria monocytogenes*

1.1 História

Atribui-se a Murray, Webb e Swann, em 1926, a descoberta e descrição do microrganismo Gram-positivo actualmente conhecido como *Listeria monocytogenes*. Estes autores descreveram uma infecção espontânea que ocorreu entre os coelhos e cobaios de laboratório, tendo denominado o agente de *Bacterium monocytogenes*, em virtude de a infecção ser caracterizada por uma monocitose (Farber & Peterkin, 2000).

Em 1927, Pirie, na África do Sul, isolou o mesmo agente a partir de roedores selvagens, denominando-o *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cirurgião Lord Lister. O agente passou a ser denominado *Listerella monocytogenes*, pelo facto de ser parecido com o agente isolado pelos autores ingleses (Farber & Peterkin, 2000).

Em 1940, autores ingleses propuseram que o agente passasse a ser denominado *Listeria monocytogenes* devido à existência de um género já descrito com a designação *Listerella*.

Desde então o microrganismo foi caracterizado de forma definitiva como *Listeria monocytogenes* (Gray & Killinger 1966; Hofer & Reis, 2005;).

1.2 Taxonomia

Segundo *The Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea* (Garrity et al., 2007), baseado na análise filogenética do gene que codifica para 16S rRNA, o género *Listeria* encontra-se classificado na classe *Bacilli*, ordem - *Bacillales* e família - *Listeriaceae*.

O género *Listeria* é composto por bactérias Gram positivas com baixo conteúdo de G+C e está estreitamente relacionado com os géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* (Seeliger & Jones, 1986; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

As análises filogenéticas e métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do género *Listeria*, que actualmente contém seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii* e *Listeria grayi*, como evidenciado pelos valores de homologia de DNA, sequência de rRNA 16S, propriedades quimiotaxonómicas e análise por *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MEE) (McLauchlin, 1997; Rocourt, 1999; Donnelly, 2001).

A sequência do primeiro genoma completo de *L. monocytogenes* foi determinado por um consórcio Europeu em 2001 (Figura 1), ao mesmo tempo que *Listeria innocua*, uma espécie estreitamente relacionada mas não patogénica. O genoma da estirpe sequenciada de *L. monocytogenes* tem um tamanho de 2.944.528 bp, com uma média de 39% de G+C e contém 2.853 genes codificantes de proteína. No caso de *L. innocua*, possui um único cromossoma circular de 3.011.209 bp com um teor médio de 37% de G+C. Dentro do género *Listeria*, estas duas espécies apresentam um alto grau de homologia na sequência de rRNA 16S, sendo as de maior proximidade taxonómica (Cossart & Archambaud, 2009).

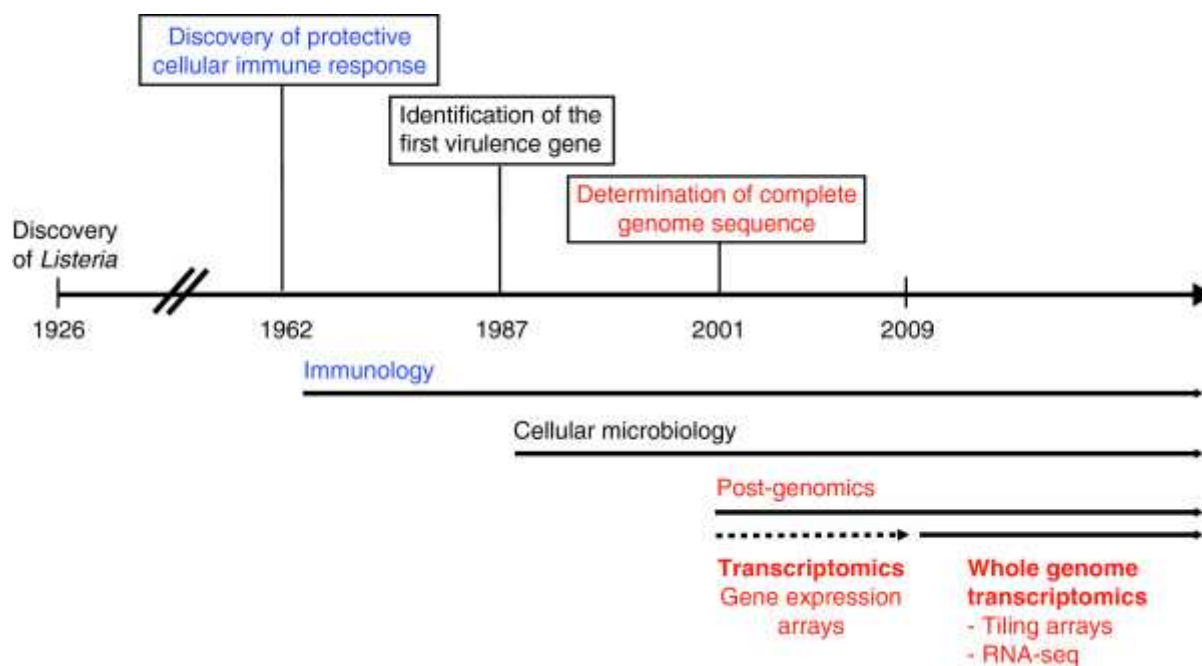


Figura 1 - Chave de datas e acontecimentos e respectivas áreas de investigação relacionadas com *Listeria* desde a sua descoberta em 1926.

Fonte: Cossart & Archambaud (2009)

1.3 Morfologia

As bactérias do género *Listeria* são pequenos bacilos Gram-positivos, de 0,4 - 0,5 µm de largura e 0,5 – 2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas (Phan-Thanh *et al.*, 2000). Podem ser observados isolados ou em cadeias curtas e em paliçada (Ryser & Marth, 1991). Assemelham-se a cocos em culturas envelhecidas e nestas condições perdem a capacidade em reter os corantes de Gram (essencialmente o cristal de violeta), o que leva frequentemente a erros de identificação (Seeliger & Jones, 1986). Não formam esporos nem cápsula, são anaeróbios facultativos, móveis devido à presença de flagelos peritricos e, em meio semi-sólido e a 20-25 °C, apresentam mobilidade típica de guarda-chuva (Bille & Rocourt, 2003).

1.4 Características culturais e bioquímicas

De um modo geral, as bactérias do género *Listeria* multiplicam-se na maioria dos meios bacteriológicos, sem necessidade de nutrientes especiais, crescendo bem em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e em caldo de soja e tripticase (Jay, 1996).

Em gelose nutritiva, dão origem a pequenas colónias com 0,5 a 1,5 mm, translúcidas, ligeiramente convexas, redondas e de bordos lisos (Seeliger & Jones, 1986). Com iluminação normal as colónias apresentam coloração azul acinzentada. Quando observadas com luz incidente oblíqua (iluminação de Henry) apresentam uma coloração verde-azulada característica. Após sucessivas repicagens, as colónias de *Listeria* que apresentam a forma lisa podem transformar-se em rugosas, com bordos ondulados e superfície granulosa (Seeliger, 1961 citado por Ryser & Marth, 1991).

Preferem meios com pH neutro ou ligeiramente alcalino, no entanto a multiplicação destas bactérias pode ocorrer a valores de pH inferiores a 4,5 até 9,4 (ICMSF, 1996).

L. monocytogenes é anaeróbia facultativa, crescendo em ambiente com concentrações reduzidas de oxigénio e elevadas de CO₂ (Seeliger & Jones, 1986; Ryser & Marth, 1991). Pode tolerar concentrações de 10% a 30% de cloreto de sódio e crescer em meios com actividade de água de 0,90, dependendo de outros factores que influenciam a multiplicação, como o pH e a temperatura (Lovett, 1989).

Apresenta reacção catalase positiva e oxidase negativa; expressa β-hemolisina, produzindo uma zona clara em meio de cultura Agar-sangue (Farber & Peterkin, 1991; Holt *et al.*, 1994). Produz ácido por fermentação de glucose, frutose, manose, galactose, celobiose, maltose, melezitose, trealose e ramnose, sem formação de gás; hidrolisa

esculina, salicina, amigdalina e hipurato de sódio; apresenta teste vermelho de metilo positivo e Voges Proskauer positivo; produz amónia a partir da arginina; não produz sulfureto de hidrogénio, indol e nitrato redutase; liquefaz gelatina; hidrolisa amido e ureia; reduz telurito e é parcialmente inibida por 0,02% de azida e cianida (Jay, 1996).

1.5 Características ecológicas e fisiológicas

Com carácter ubiqüitário, a espécie *monocytogenes* encontra-se largamente distribuída no ambiente, tendo sido isolada de águas superficiais (Lyautey *et al.*, 2007), esgotos domésticos, águas residuais de indústrias de lacticínios e de matadouros, solos, insectos, adubo orgânico e fezes de animais, aves e mamíferos, especialmente grandes ruminantes (bovinos) (Nightingale *et al.*, 2004) e de humanos. Pode também ser isolada em diversos produtos alimentares crus ou após tratamento térmico ou químico (Ryser & Marth, 1991; Pereira & Rocourt, 1993; Franco & Landgraf, 1996). Acredita-se que de 1% a 10% da população seja portadora intestinal deste patogénio (Hof, 2003).

Segundo Sleator *et al.* (2001), o perigo de *L. monocytogenes* como risco associado aos alimentos é, em grande parte, devido à sua capacidade de se adaptar a condições adversas, quer a nível do ambiente exterior, que antecede a ingestão dos alimentos, quer no interior do hospedeiro.

1.5.1 Temperatura

As bactérias do género *Listeria*, particularmente *L. monocytogenes*, multiplicam-se a temperaturas entre 1 a 45° C, com temperatura óptima de crescimento entre 30 a 37° C, existindo no entanto relatos sobre o seu crescimento a 0° C. Suportam ainda repetidos

congelamentos e descongelamentos (Seeliger & Jones, 1986; Lovett, 1988; Franco & Landgraf, 1996; Germano & Germano, 2001). Às temperaturas de refrigeração (4° C), o crescimento populacional de *L. monocytogenes* é muito lento, sendo a fase de latência (fase lag), e o tempo de geração, afectados pela temperatura à qual o inóculo foi cultivado, bem como por outros factores como a concentração de sal, o pH e a presença de bacteriocinas (Gandhi & Chikindas, 2007).

Quanto à termotolerância, esta bactéria demonstrou ser uma das mais resistentes ao calor, quando comparada com outras bactérias patogénicas não esporuladas, associadas aos alimentos (Makey & Bratchell, 1989). A pasteurização do tipo HTST (*High Temperature Short Time*) é efectiva na sua eliminação. A pasteurização clássica e a rápida podem torna-se ineficazes se o número de organismos exceder o número de 1000/ml de leite, sugerindo que os microrganismos dentro dos leucócitos os tornam mais resistentes (Fleming *et al.*, 1985). Esta termotolerância parece estar dependente do teor inicial e de características intrínsecas de cada estirpe e das condições experimentais (Sutherland & Porritt, 1997).

1.5.2 Concentração de sal (NaCl)

Estudos realizados por diversos autores demonstraram que *L. monocytogenes* é um microrganismo halotolerante, que sobrevive a elevadas concentrações de sal, podendo esta capacidade variar em função da temperatura, pH e a_w .

Seeliger (1961) citado por Miller (1992) demonstrou que algumas estirpes de *L. monocytogenes* toleravam 20% de NaCl ($a_w = 0,86$) durante curtos períodos de tempo, mas que podiam permanecer viáveis após um ano em 16% de NaCl ($a_w = 0,90$), a pH = 6,0.

Outros estudos constataram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em 10,5% e 13%, quando incubada a 37°C durante 15 e 10 dias respectivamente. Em concentrações de 20 a 30% de NaCl, o tempo de sobrevivência foi reduzido para 5 dias. Mas, se a temperatura for reduzida para 4°C, a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5 e 30,5% de NaCl (Franco & Landgraf, 1996). Martinis *et al.* (1997) relataram que *L. monocytogenes* é capaz de crescer em meios contendo 10% de NaCl com pH 7,0 a 25°C e em 20% de NaCl a 4°C por oito semanas.

A capacidade das populações de *Listeria* crescerem numa gama de concentrações de sal bastante elevada tem sido associada à acumulação de solutos orgânicos intracelulares (Guerra, 2003).

1.5.3 Concentração hidrogeniônica (pH)

Embora o pH ótimo para o crescimento de *Listeria* seja próximo da neutralidade ou ligeiramente alcalino (6,0 a 8,0) (Lovett, 1988), considera-se que *L. monocytogenes* é capaz de se multiplicar numa escala de pH entre 4,3 e 9,6 (Ryser & Marth, 2007).

Para Wang & Johnson (1997), o pH é o factor ambiental mais importante no controlo da sobrevivência de *L. monocytogenes* nos alimentos. Para estes autores a taxa de sobrevivência e de multiplicação de *L. monocytogenes* está geralmente relacionada com o pH inicial dos produtos, pois em estudos realizados verificaram que as maiores taxas de crescimento populacional ocorreram a valores de pH iguais ou superiores a 6, verificando-se desenvolvimento em muito menor escala ou a sua ausência, a pH inferior a 5. Observaram ainda que em produtos alimentares ácidos (pH < 4,5) *L. monocytogenes* não sobrevivia.

Segundo vários autores, a tolerância à acidez pode também estar relacionada com a adaptação a situações de stresse, tendo já sido demonstrado que *L. monocytogenes* é capaz de resistir a valores de pH habitualmente considerados letais após ter sido exposta a valores de pH sub-letais (situação denominada de resposta ácidotolerante) (Ribeiro *et al.* 2006).

Segundo Lou & Yousef (1997), a adaptação de *L. monocytogenes* a níveis sub-letais de stresse ambiental, seja por ácidos, sais, altas ou baixas temperaturas ou por privação de nutrientes, eleva a capacidade de sobrevivência deste agente patogénico durante os processos de congelamento, armazenamento e aos ciclos de congelamento-descongelamento).

Vários estudos demonstram que a virulência de estirpes de *L. monocytogenes* pode diferir e que a patogenicidade deste microrganismo é afectada por vários factores (Viallette *et al.*, 2003). O mecanismo de resposta ácidotolerante é muito importante para a saúde pública, porque ela aumenta a capacidade de sobrevivência celular sob condições ácidas letais em habitats naturais, alimentos e hospedeiros, aumentando dessa forma a virulência destas estirpes (Bonnet & Montville, 2005)

1.5.4 Actividade da água (a_w)

A actividade da água (a_w) óptima para o crescimento de *L. monocytogenes* é próxima de 0,97, contudo foi observada a sua sobrevivência em alimentos desidratados com a_w inferior a 0,93, levando a supor que pelo menos durante um certo período seja capaz de tolerar condições de baixa a_w (Franco & Landgraf, 1996).

2. Listeriose

2.1 Características da doença

A listeriose é uma zoonose originada por bactérias do género *Listeria*, mas apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são conhecidas como sendo patogénicas. *L. ivanovii* causa principalmente doenças em animais, enquanto *L. monocytogenes* causa listeriose em animais e seres humanos (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; McLauchlin *et al.* 2004; Keto-Timonen, 2008).

Ocorre principalmente em pessoas pertencentes a certos grupos de risco, tais como mulheres grávidas, crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos como os submetidos à terapia prolongada com corticosteróides ou à quimioterapia, os portadores de HIV, os alcoólicos, os diabéticos e os submetidos à hemodiálise (Marth, 1988).

A infecção é rara mas a taxa de mortalidade varia de 20 a 30%, podendo chegar aos 75% nos grupos de risco (Linnan *et al.*, 1984; Schuchat *et al.*, 1991).

A transmissão é feita principalmente por contacto com animais infectados, por contaminação cruzada e através da ingestão de alimentos contaminados (Bell & Kyriakides, 1998), sendo considerada esta última a via principal, tanto para o homem como para os animais (MacLauchlin *et al.*, 2004).

O período de incubação de *Listeria monocytogenes* desde a contaminação, através da ingestão de água ou alimento contaminado, até ao aparecimento dos primeiros sintomas pode variar de 10-70 dias. Este facto dificulta a descoberta da fonte de contaminação no caso de surto da doença (Lecuit, 2007).

A sintomatologia é do tipo gastrointestinal, mas também pode originar o aparecimento de septicemia e meningoencefalites com elevada mortalidade. No homem, a listeriose apresenta-se sob formas clínicas graves, como septicemia e meningite. Nas mulheres grávidas pode apresentar-se de maneira assintomática ou com sintomas de gripe. No entanto, pode provocar aborto, nascimento prematuro, morte fetal, meningite ou septicemia neonatal severa (Rocourt & Bille, 1997; Rocourt *et al.*, 2000).

Nos animais domésticos (especialmente ovinos e caprinos) a listeriose está associada a encefalite, aborto, mastite ou septicemia. No entanto, os animais também podem ser portadores assintomáticos e disseminar o organismo em números significativos, contaminando o meio ambiente (EFSA, 2009).

Apesar de não ser uma doença recente, só há relativamente pouco tempo foi associada ao consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes*. Efectivamente, a origem alimentar da listeriose só foi comprovada em 1981, no decorrer de um surto provocado pela ingestão de repolho cru contaminado com a bactéria (Schlech *et al.*, 1983), a que se seguiram vários surtos e um aumento geral da incidência na Europa e América do Norte durante a década de oitenta (McLauchlin, 1996).

De acordo com os últimos relatórios da Comunidade sobre zoonoses, publicados em Janeiro de 2009 e 2010 (EFSA, 2009, 2010), o número de casos de infecções por *Listeria monocytogenes* em humanos decresceu ligeiramente (sendo relatados 1588 casos em 2006, 1558 em 2007 e 1381 em 2008) em relação ao aumento que houve de 2004 a 2006 (Figura 2). O maior número de notificações e a maior taxa de mortalidade, quer em 2007 quer em 2008, foi para o grupo etário acima de 65 anos, seguido pelas crianças com menos de 5 anos. A taxa de mortalidade total, em 2008, foi de 20,5% (EFSA, 2010).

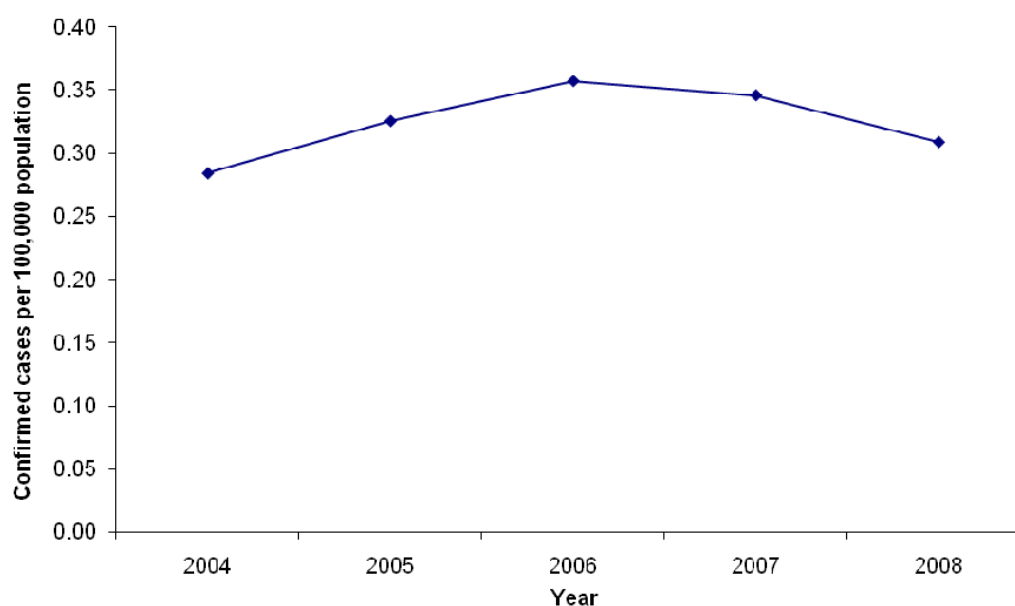


Figura 2 - Taxas de notificação de casos confirmados de listeriose humana na UE, 2004-2008¹

Legenda: Países que forneceram dados: Áustria, Bélgica, República Tcheca, Dinamarca, Estónia, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Hungria, Irlanda, Itália, Letónia, Lituânia, Holanda, Polónia, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Suécia, Reino Unido.

1. Inclui casos confirmados de 2005-2008 e o total de casos em 2004.

Fonte: EFSA (2010)

2.2 Virulência – serotipos implicados em listeriose

Segundo Bolivar *et al.* (2008), têm-se encontrado diferenças significativas na virulência de isolados clínicos que mostram dose letal mais baixa, quando comparados com os alimentos. Não obstante, qualquer estirpe de *L. monocytogenes* deve ser considerada patogénica para os grupos de risco.

Estudos realizados anteriormente determinaram que *L. monocytogenes* é um microrganismo patogénico com estrutura clonal, diferenciando os vários grupos clonais quanto ao seu potencial patogénico (Piffaretti *et al.*, 1989; Wiedmann *et al.*, 1997), à

especificidade pelo hospedeiro e à adaptação a diferentes nichos ecológicos (Boerlin & Piffaretti, 1991).

Rasmussen *et al.* (1995) demonstraram que *L. monocytogenes* se divide em três linhagens segundo a sequência dos genes de virulência *hly*, *iap* e gene *fla* que codifica para flagelina. Wiedmann *et al.* (1997) confirmaram a existência das três linhagens geneticamente distintas, mediante ribotipagem e PCR-RFLP do gene de virulência *hly*. A linhagem I contém os serovares 1/2b, 3b, 3c e 4b, a linhagem II compreende os serovares 1/2a, 1/2c e 3a e a linhagem III os serovares 4a e 4c. Mais tarde, a esta terceira linhagem foi incluído o serotipo 4b (Roberts *et al.*, 2006).

Os isolamentos da linhagem I incluem os clones epidêmicos de *L. monocytogenes* que são responsáveis por um grande número de casos humanos de listeriose (Sauders *et al.*, 2006). Os isolamentos da linhagem II provêm de alimentos e ambiente, enquanto os da linhagem III são fundamentalmente de origem animal (Kathariou, 2002).

Para investigar a diversidade genética de estirpes de *L. monocytogenes* com diferentes potenciais de virulência, Doumith *et al.* (2004) sequenciaram parcialmente estirpes de uma epidemia de serotipo 4b e compararam com a sequência completa da estirpe não epidêmica serovar 1/2a de *L. monocytogenes* EGDe. Deste estudo foi identificada uma divergência genética inesperada entre as duas estirpes, com cerca de 8 % das sequências específicas para o serotipo 4b. Essas sequências incluíam sete genes codificados para proteínas de superfície, dois dos quais pertencem à família internalina, e três genes codificados para reguladores de transcrição, que são importantes nas diferentes etapas do processo infeccioso.

Uma das observações mais marcantes deste estudo foi a magnitude da divergência que existe dentro da espécie *L. monocytogenes*. Estes autores descobriram que a divergência genética entre as linhagens I e II de *L. monocytogenes* (cerca de 8%) foi quase igual à diferença entre as sequências da estirpe *L. monocytogenes* EGDe serotipo 1/2a e a *L. innocua* (10%) (Doumith *et al.*, 2004).

No final da década de 80 foi descoberto na *L. monocytogenes* o gene *hly*, responsável pela produção da hemolisina, também denominada listeriolisina O (LLO). Essa foi a descoberta do primeiro gene de virulência de *Listeria* e também o primeiro produto de gene que actua na protecção do parasita dentro de uma célula eucariótica. A listeriolisina O é uma importante enzima que ajuda a bactéria a escapar da acção de enzimas dos fagossomas do sistema imunitário do hospedeiro. Dentro do fagossoma o pH é mais ácido, isso estimula a bactéria a libertar a listeriolisina O que começa a destabilizar a membrana do fagossoma, e, assim, induz a formação de poros na sua membrana, até o seu completo rompimento. Após esse rompimento, enzimas hidrolíticas são libertadas no citosol da célula hospedeira, provocando a sua destruição (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Os mecanismos pelos quais *L. monocytogenes* causa a listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se que é um patógeno intracelular com capacidade de penetrar, multiplicar-se no interior do citoplasma da célula do hospedeiro (macrófagos, fibroblasto, eritrócitos) e invadir células adjacentes sem deixar o citoplasma do hospedeiro (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

No hospedeiro infectado, esta bactéria é maioritariamente intracelular, devido à sua capacidade para resistir à morte do macrófago e da sua propriedade requintada para invadir uma variedade de células não-fagocíticas incluindo células epiteliais, tais como os enterócitos do intestino (Cossart & Archambaud 2009).

Rousseaux *et al.* (2004) afirmam que a patogenia da doença começa com a adesão da *L. monocytogenes* na superfície das células epiteliais intestinais. Essa adesão ocorre por meio de proteínas de superfície específicas do gênero *Listeria* spp., denominadas Internalina A (InIA) e Internalina B (InIB). Os autores afirmam ainda que, além da atividade hemolítica presente em apenas algumas espécies de *Listeria* spp., a não virulência das espécies apatogénicas para humanos pode ser devido a mutações ocasionadas no gene que codifica as proteínas de superfície nestas espécies.

Habitualmente consideram-se virulentas todas as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas a partir de alimentos, embora seja unanimemente aceite a existência de uma grande variabilidade no grau de virulência entre estirpes (UCP/ESB, 2008)

A dificuldade de recuperar organismos envolvidos nos surtos; a subnotificação e a demora na realização de análises convencionais são alguns dos importantes factores que retardam ou impedem interacções em situações de emergência.

Nos últimos anos, porém, as técnicas moleculares de sequenciação genética, e principalmente as análises genéticas comparativas, têm promovido um grande avanço na precisão e rapidez, para a obtenção de dados relativos ao patógeno, no que se refere ao entendimento da sua biologia, factores de virulência, evolução, diferenças fenotípicas e, conseqüentemente, nas acções de diagnóstico e prevenção. (Vázquez-Boland *et al.* 2001, Byun *et al.* 2001, Beumer *et al.* 2003, Buchrieser *et al.* 2003).

Wagner e Allerberger (2003), recomendam cuidados na interpretação de resultados aquando da investigação de surtos de listeriose, devendo ser considerados factores como: colheita dos alimentos suspeitos; distribuição geográfica dos casos e duração do

surto. A vigilância epidemiológica, inclusive internacional, faz-se necessária pelos factores principais:

- a) o longo tempo de incubação da doença permite a disseminação do contaminante;
- b) grau de contaminação do alimento;
- c) condição imunológica da população atingida;
- d) hábitos de consumo; e,
- e) virulência da estirpe envolvida.

2.3 Dose infecciosa

Devido à dificuldade em realizar pesquisas com voluntários saudáveis, ainda não foi possível estabelecer a dose infecciosa de *L. monocytogenes*. Dados colhidos em surtos de listeriose sugerem que os alimentos envolvidos continham elevados níveis de *L. monocytogenes*, da ordem de 10^6 UFC/g (FDA/FSIS, 2003). Contudo, para a definição exacta da dose infecciosa, são necessários mais dados epidemiológicos (Rocourt & Cossart, 1997).

A dose infecciosa pode variar conforme a estirpe e o estado imunitário do hospedeiro. O longo período de incubação, em alguns casos superiores a 70 dias, dificulta a determinação da dose infecciosa. No entanto, considera-se que o consumo de alimentos com concentrações de *L. monocytogenes* que não excedam 100ufc/g representa um baixo risco para o consumidor (UCP/ESB, 2008).

Devido à severidade das infecções causadas por *L. monocytogenes*, e considerando que a dose infecciosa ainda não está bem elucidada, agências reguladoras dos EUA adoptaram a política de tolerância zero, isto é, ausência de *L. monocytogenes* em alimentos prontos para consumo (Eklund *et al.*, 1995). Esta legislação resultou em efeitos

benéficos, ocorrendo um declínio acentuado dos casos de listeriose (cerca de 40%), incluindo infecções perinatais. Esta redução resultou da melhoria dos padrões de higiene, adopção de Boas Práticas de Fabrico (BPF), e do programa de Análise de Perigos e Controlo de Pontos Críticos (HACCP) (Tappero *et al.*, 1995).

2.4 Listeriose em Portugal

Em Portugal, os dados relativos às doenças de origem alimentar são escassos. No que diz respeito à listeriose, existem dados que sugerem a existência de uma elevada incidência de contaminação por *Listeria monocytogenes* em alguns alimentos, mas a doença que provoca, por não ser de declaração obrigatória, está subestimada (Viegas, 2009).

De acordo com os dados publicados pela Organização Mundial de Saúde, durante o período de 1993-2000, não foram registados casos ou surtos de listeriose em Portugal.

Com o objectivo de contribuir para o conhecimento da listeriose em Portugal, Almeida *et al.* (2006) compilaram um estudo retrospectivo de casos identificados no período entre 1994 e 2003, inclusive (Quadro 1). Dos 35 casos de listeriose identificadas para este período foi estimada uma taxa de mortalidade de 17%. De acordo com os dados recolhidos no presente estudo para o ano de 2003, a incidência desta doença em Portugal foi de pelo menos 1,4 casos por milhão de habitantes. A idade dos pacientes, relatada para 20 dos 35 casos, variou entre recém-nascidos (5 recém-nascidos, 25%) e 85 anos (6 com mais de 65 anos, 30%), predominantemente do sexo masculino (13 dos 21 casos registados, 62%).

O estudo demonstra, pela primeira vez na literatura amplamente disponível, que apesar de não serem registados em relatórios oficiais casos de listeriose em Portugal, a ameaça de *L. monocytogenes* para a saúde pública é de uma dimensão semelhante à que se verifica noutros países.

Quadro 1 - Listeriose em Portugal: 1994–2003

Data de isolamento	Idade†/Sexo*†	Factores predisponentes	Manifestações clínicas†	Isolado de‡	Resultado clínico†
Novembro 1994	Recém-nascido/M	Idade	DNR	Fígado	Fatal
1996	DNR/M	HIV	Febre	Sangue e CSF	DNR
Julho 1997	DNR	DNR	DNR	Sangue	DNR
Setembro 1997	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
Outubro 1997	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
1998	54/M	DNR	DNR	Sangue	DNR
Abril 1998	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
Janeiro 1999	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
Julho 1999	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
Setembro 1999	DNR	DNR	DNR	Sangue	DNR
Outubro 1999	Recém-nascido/F	Idade	DNR	Pulmão	Fatal
2000	48/M	DNR	Febre e dor de cabeça	CSF	DNR
2000	25/F	Gravidez	Síndrome gripal 15 dias antes do parto	Cultura vaginal	Nascimento às 36 semanas de gravidez
2000	Recém-nascido/DNR	Idade	Hipotonia, dificuldades de respiração, sepsis ano nascimento. Apgar 5 (1 min) – 7 (5 min)	Sangue	Favorável, sem sequelas
Março 2000	DNR	DNR	DNR	Sangue	DNR
Abril 2000	DNR	DNR	DNR	Sangue	DNR
Junho 2000	DNR	DNR	DNR	CSF	DNR
Outubro 2000	DNR	DNR	DNR	Sangue	DNR
Mai 2001	41/M	Cirrose	DNR	Sangue	Fatal
Outubro 2001	85/M	Idade	DNR	Sangue	Fatal
Fevereiro 2002	DNR/M	DNR	Meningite	CSF	DNR
Manço 2002	55/M	Doença hematológica	DNR	Sangue	Favorável
2003	75/F	Insuficiência renal crónica	DNR	Sangue	Favorável
2003	Recém-nascido/DNR	Idade	DNR	Sangue	Favorável
2003	DNR/F	DNR	DNR	Cultura vaginal	DNR
2003	DNR/F	DNR	DNR	Cultura vaginal	DNR
Janeiro 2003	69/M	Idade	DNR	Sangue	Favorável
Fevereiro 2003	74/F	Idade	Meningite	CSF	Favorável
Fevereiro 2003	31/F	Gravidez	DNR	Placenta	Favorável
Abril 2003	Recém-nascido/DNR	Idade	DNR	Sangue	Favorável, sem sequelas
Abril 2003	67/M	Corticoterapia. Síndrome nefrítico	Meningite	Sangue, CSF e líquido ascítico	Fatal (choque séptico)
Mio 2003	25/M	DNR	Meningite	CSF	DNR
Jullho 2003	85/F	Idade	DNR	CSF	DNR
Outubro 2003	50/M	Alcoolismo	DNR	Sangue/CSF	Fatal
Novembro 2003	48/M	DNR	DNR	CSF	Com retorno de internamento, sem sequelas

† DNR - Dados Não Registados.
Fonte: Almeida *et al.* (2006)

*F - Feminino; M - Masculino.

‡ CSF – Líquido Cerebrospinal.

Em Portugal, contrariamente ao que acontece noutros países, não existe informação destinada aos grupos de risco de modo a prevenir/reduzir o contacto com *L. monocytogenes*. De acordo com o trabalho apresentado pelo *International Life Sciences Institute* (2004), a utilização de mensagens com suporte científico na educação dos grupos de risco e dos profissionais que lhes prestam assistência é uma das principais estratégias a adoptar com vista à redução da incidência de listeriose. A cooperação de diferentes instituições e profissionais, como médicos, investigadores, consumidores, produtores e autoridades de saúde é uma necessidade imperativa para a prevenção e controlo de *L. monocytogenes* de forma a evitar o incremento previsível dos casos de listeriose (UCP/ESB, 2008).

2.5 Surtos de listeriose associados ao consumo de produtos lácteos

A confirmação de vários casos esporádicos e surtos de listeriose ocorridos no Canadá, Estados Unidos e Europa (Ryser, 1999) na década de 80, associados principalmente ao consumo de queijos e de vegetais crus, levou à inclusão de *L. monocytogenes* na lista de microrganismos patogénicos causadores de doenças transmitidas por alimentos. A partir dessa década, um grande número de surtos e casos de listeriose tem sido relatado na literatura (Borges et. al., 2009). Alguns dos principais surtos relacionados com o consumo de leite e produtos lácteos são apresentados na Quadro 2.

Quadro 2 - Surtos de listeriose associados ao consumo de leite e produtos lácteos

Ano	País	Produto	Nº casos/mortes	Referência
1983	Estados Unidos	Leite pasteurizado	49/14	Fleming <i>et al.</i> (1985)
1985	Estados Unidos	Queijo Jalisco	142/48	Linnan <i>et al.</i> (1988)
1989/1990	Dinamarca	Queijo azul	26/0	Jensen <i>et al.</i> (1994)
1994	Estados Unidos	Leite achocolatado	3/0	Dalton <i>et al.</i> (1997)
1995	França	Queijo Brie de Meaux	33/0	Jacquet <i>et al.</i> (1995)
1995	França	Queijo pasta mole	37/11	Goulet <i>et al.</i> (1995)
1997	França	Queijo Pont l'Évêque	14/0	Jacquet <i>et al.</i> (1995)
1998/1999	Finlandia	Manteiga	80/4	Lyytikainen <i>et al.</i> (2000)
2000/2001	Estados Unidos	Queijo tipo mexicano	13/0	MacDonald <i>et al.</i> (2005)
2001	Japão	Queijo	86/0	Makino <i>et al.</i> (2005)
2002	Canadá	Queijo	17/0	Gaulin <i>et al.</i> (2003)
2007	Estados Unidos	Leite pasteurizado	5/3	CDC <i>et al.</i> (2008)

Adaptado de Borges *et al.* (2009)

3. Fontes de contaminação de alimentos por *L. monocytogenes*

3.1 Existência no meio ambiente

L. monocytogenes, considerada uma bactéria ubiqüitária, encontra-se amplamente distribuída no ambiente, sendo encontrada no solo, na vegetação, na água e no esgoto. (Hof, 2003). Os principais reservatórios de *Listeria* são solo, forragem e água. Outros reservatórios incluem os animais domésticos e selvagens infectados (EFSA, 2009). Como atrás foi referido, também se crê que 1% a 10% da população seja portadora intestinal deste patógeno (Hof, 2003).

O aparecimento de *Listeria* na matéria fecal dos ruminantes, bem como nos seus alimentos (silagem), faz com que a bactéria surja com regularidade, no leite e nas fábricas de laticínios e, por consequência, se corra o risco de contaminação dos produtos lácteos (Wehr, 1987; Skovgaard & Morgen, 1988; Perry & Donnelly, 1990 citados por Guerra, 2003).

Um estudo realizado por Nightingale *et al.* (2004) suporta a hipótese de que os ruminantes, em particular os bovinos, representam nas explorações um reservatório de infecção para *L.monocytogenes*. Estes autores mostraram que a permanência e transmissão de *L. monocytogenes* nas explorações parece ser devida à ingestão de alimentos contaminados, à sua multiplicação no hospedeiro, seguida da dispersão de fezes para o ambiente agrícola.

3.2 Presença nas unidades fabris processadoras de alimentos

Embora presente no ambiente e na matéria-prima alimentar, uma das maiores fontes de contaminação dos produtos alimentares é o próprio ambiente fabril. A colonização de

equipamentos e utensílios tem sido relatada como a principal causa de contaminação do produto acabado. Diversos estudos concluíram que o perfil genético do produto acabado é idêntico ao dos isolados provenientes de máquinas e utensílios utilizados na produção (Destro, 1996; Vogel *et al.*, 2001; Martinez *et al.* 2003; Nakamura *et al.* 2004; Aguado *et al.* 2004; Pintado, 2009).

As instalações e os equipamentos das unidades fabris de processamento de alimentos constituem uma fonte de contaminação, sobretudo quando não são respeitadas as boas práticas de fabrico e de higiene, o que pode conduzir ao aparecimento de biofilmes e a focos de multiplicação bacteriana de difícil remoção e (Brackett, 1992; Jeong & Frank, 1994; Sergelidis *et al.*, 1997, citados por Guerra, 2003).

Segundo Walker *et al.* (1991) e Pak *et al.* (2002), nas fábricas de laticínios e queijarias a principal fonte de contaminação de *L. monocytogenes* é o ambiente das próprias unidades (drenos e pavimentos, especialmente os de áreas de refrigeração ou locais sujeitos a contaminação exterior). Num estudo realizado por Silva & Pintado (2000), numa unidade de produção de queijo de ovelha da região da Beira Baixa, as zonas da salga e de lavagem dos queijos demonstraram ser as mais críticas.

Além das instalações e equipamentos, *L. monocytogenes* também pode sobreviver e ser disseminada por aerossóis e mãos dos manipuladores de alimentos (Sutherland & Porrit, 1997). Devido à sobrevivência em aerossol ou em células que aderem às superfícies de contacto, a bactéria prolifera em micro colónias formando biofilmes pela inadequada limpeza e higienização (Sasahara & Zottola, 1993). Por outro lado, quando os pontos de saída das instalações de tratamento de efluentes se localizam nas proximidades das zonas de processamento, podem constituir uma fonte de contaminação de *Listeria*

reintroduzindo o microrganismo no ambiente fabril, para além de constituírem um foco importante de contaminação ambiental em geral (Sutherland & Porrit, 1997).

3.3 Ocorrência em alimentos

Como já foi referido, *Listeria monocytogenes* tem vindo a ser reconhecida, nos últimos anos, como um dos agentes mais problemáticos em higiene e segurança alimentar.

Em Portugal, este microrganismo tem sido encontrado com elevada frequência em queijos (Duarte, 1992; Guerra & Bernardo, 1997; Mena *et al.*, 2004; Pintado *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2006; Chambel *et al.*, 2007), carnes (Esteves *et al.*, 1996) e pescado (Pedro, 1996).

As investigações epidemiológicas têm demonstrado que quase todos os alimentos podem transmitir *L. monocytogenes* e que a maioria dos casos esporádicos e surtos estão associados a alimentos processados. Contudo, os dados recolhidos sugerem a existência de alimentos mais perigosos que outros, sendo os de maior risco os “prontos a comer”, armazenados a temperaturas de refrigeração durante longos períodos, com potencial para sofrerem contaminação por *L. monocytogenes* e que suportem a multiplicação desta bactéria em grandes números (ILSI, 2005).

Nos termos do Regulamento (CE) n.º 2073/2005 da Comissão de 15 de Novembro de 2005, relativo aos critérios microbiológicos aplicáveis aos produtos alimentares, os operadores das empresas do sector alimentar devem cumprir os critérios de segurança alimentar relativos a *Listeria monocytogenes*, no que diz respeito a alimentos prontos para consumo sob boas práticas de higiene e de programas de análise de perigos e pontos críticos de controle (HACCP) (EFSA, 2009).

Os últimos relatórios da EFSA - ECDC mostraram que as taxas mais elevadas de incumprimento (>100 UFC/g) dos critérios relativos a *Listeria monocytogenes* foram registados em produtos prontos a comer de peixe (como o peixe fumado), de carne e queijos (EFSA, 2009).

3.3.1 Leite e produtos lácteos

L. monocytogenes pode ser excretada no leite, tanto de fêmeas doentes, como de animais aparentemente são (portadores assintomáticos), caso relatado por Pintado *et al.* (2009), em que foi provada a existência de relação epidemiológica entre uma estirpe de *L. monocytogenes* e ocorrência de mamite sub-clínica numa ovelha. Alguns animais podem excretar o microrganismo em grande número, durante longos períodos, podendo ultrapassar os nove meses (Contreras *et al.*, 2007). Por outro lado, a presença ocasional deste microrganismo no intestino de animais são torna possível a contaminação das camas, do ambiente, dos úberes dos animais e, conseqüentemente, do leite (Gahan & Collins, 1991; Rea *et al.*, 1992 citados por Guerra, 2003).

Estudos realizados no Canadá e nos Estados Unidos da América permitiram concluir que *L. monocytogenes* pode ser encontrada no leite cru em percentagens que variaram entre 1,3 e 5,4% (Lovett *et al.*, 1987; Farber *et al.*, 1988; Liewen & Plantz, 1988; Hassan *et al.*, 2001). Têm sido igualmente efectuados isolamentos a partir de leite pasteurizado, leite em pó, queijos, iogurte, gelados e manteiga. No entanto, do conjunto de produtos referidos, os queijos de pasta mole e semi-mole são os que têm oferecido uma maior percentagem de isolados de *Listeria* (Rocourt *et al.*, 2003).

Em Portugal, esta bactéria tem sido isolada em amostras de leite cru, em queijos frescos e em queijos curados (Quadro 3).

Quadro 3 – Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos

Amostra	N	% L. monocytogenes	Referência
Leite cru de vaca	54	5,6	Guerra & Bernardo (2000)
Leite cru de vaca	6	16,7	Mena <i>et al.</i> (2004)
Leite cru de ovelha e cabra	102	2,0	Guerra & Bernardo (2000)
Leite cru de ovelha	73	6,4	Pereira & Pintado (2000)
Leite cru de ovelha	63	6,3	Filipe & Pintado (2002)
Queijo fresco	131	30,1	Duarte (1992)
Queijo fresco e maturado	46	0	Guerra (1995)
Queijo de pasta dura e semi-dura	78	11,8	Guerra & Bernardo (1999)
Queijo de ovelha curado	63	46,0	Pintado <i>et al.</i> (2005)

A elevada prevalência de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem láctea, assim como a ocorrência de vários casos de listeriose associados ao consumo de queijos de pasta mole, apontam para a importância destes alimentos como veículos de transmissão da doença (Zottola & Smith, 1991).

Para prevenir a presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados, é importante a adoção de boas práticas agropecuárias, boas práticas de fabrico e aplicação de conceitos de programas de controle de qualidade total na indústria de laticínios (Silva *et al.*, 2003).

3.3.1.1 Queijo

A presença de *L. monocytogenes* no queijo é atribuída ao facto de estes serem muitas vezes fabricados com leite cru contaminado ou leite inadequadamente pasteurizado, ou ainda a contaminação durante o processo de fabrico (Zottola & Smith, 1991; Borges *et al.*, 2009).

Desde os anos oitenta que o consumo de queijo, particularmente os de pasta mole, tem estado na origem de alguns surtos de listeriose. Alguns destes queijos eram feitos com leite cru, o que levou a alguma pressão para que a produção deste tipo de queijos fosse proibida, o que já acontece nos EUA (Brito *et al.*, 2004).

Em Portugal, embora não haja conhecimento de surtos ou casos esporádicos de listeriose provocados pelo consumo de queijo, existem muitos dados que revelam uma elevada ocorrência de *L. monocytogenes* nestes produtos (Duarte, 1992; Pintado, 1996; Guerra & Bernardo, 1997; Mena *et al.*, 2004; Pintado *et al.*, 2005; Leite *et al.*, 2006; Chambel *et al.*, 2007), particularmente em queijos de pasta mole ou semi-mole.

Segundo o International Life Sciences Institute (ILSI) (2005), o queijo encontra-se na categoria dos alimentos considerados de alto risco, por possuir as características necessárias ao alojamento e crescimento de *L. monocytogenes* em elevados números; pois trata-se de um alimento pronto-a-comer, que pode ser conservado a temperaturas de refrigeração, durante longo período.

Em 2008, 11 Estados Membros (EM) da UE e um Não-EM (Suíça) relataram grandes quantidades de dados sobre *L. monocytogenes* em queijos (Quadro 4) e outros produtos lácteos prontos a consumir. Portugal informou que 6,0% das 265 amostras dos produtos desta categoria continham *L. monocytogenes* em níveis acima de 100 ufc/g.

Parece que a presença de *L. monocytogenes* em queijos duros é raramente detectada nos EM da UE e esses números só raramente atingem níveis acima de 100 ufc /g. No entanto, a bactéria foi isolada tanto de queijos fabricados a partir de matérias-primas tratadas termicamente a baixa temperatura e leite pasteurizado, bem como de queijos moles e semi-moles e queijos duros. Nos dados de 2008, *L. monocytogenes* foi detectada

na maioria das vezes em queijos moles semi-moles de leite pasteurizado. A mesma observação também foi feita para os dados de 2007.

Quadro 4 - *L. monocytogenes* em queijos de pasta mole e semi-mole feitos a partir de leite cru e tratado termicamente a baixa temperatura, 2008

Nota: Os dados só são apresentados para amostras de tamanho ≥ 25

Country	Sampling unit	Details	Units Tested Presence	<i>L. m.</i> presence in 25 g	Units Tested Enumeration	> detection = < 100 cfu/g	<i>L. m.</i> > 100 cfu/g
			N	% Pos	N	%	%
Cheeses made from milk from cows							
Bulgaria	Batch	at retail	2,826	0	-	-	-
Czech Republic	Batch	at processing plant	31	0	40	0	0
Germany	Single	at processing plant	28	3.6	-	-	-
	Single	at retail	141	0.7	68	1.5	0
Romania	Batch	at processing plant	214	0	-	-	-
	Batch	at retail	221	0	-	-	-
Total (cheeses made from milk from cows, 4 MSs)			3,461	<0.1	108	0.9	0
Switzerland	Single	at processing plant	394	0.5	-	-	-
Cheeses made from milk from sheep and goats							
Bulgaria	Batch	goat milk, at retail	25	0	-	-	-
Czech Republic	Batch	goat milk, at processing plant	31	0	40	0	0
Portugal	Batch	sheep milk, at retail	-	-	265	1.9	6.0
Slovakia	Batch	goat milk	45	0	-	-	-
Total (cheeses made from milk from sheep and goats, 4 MSs)			101	0	305	1.6	5.2
Switzerland			46	0	-	-	-
Cheeses made from mixed milk from cows, sheep and/or goats							
Austria ¹	Single	mixed milk from cows, sheep and/or goats, at retail	71	1.4	71	0	1.4
Slovakia	Batch	mixed milk from cows, sheep and/or goats	130	0	-	-	-

1. Na Áustria, *L. monocytogenes* foi detectada em 12 (2,9%) das 415 amostras de queijo não especificado fabricado a partir de leite cru ou submetido a baixo tratamento térmico, testados no processamento e no mercado.

Fonte: EFSA (2010)

Num futuro próximo, só as explorações que apresentem, de forma regular, boas práticas de higiene na produção de leite e de queijo feito com leite cru vão subsistir mas, conseqüentemente, a sua rentabilidade irá aumentar.(Brito *et al.*,2004)

E como referem os mesmos autores, a produção de queijo não se faz apenas na queijaria. Começa no ovelho com tudo o que diz respeito ao rebanho e à obtenção da principal matéria-prima – o leite; segue -se a queijaria com a transformação de leite em queijo; e depois o consumo com a distribuição, o comércio e as práticas do consumidor

4. Métodos de tipagem usados na caracterização de *L. monocytogenes*

Os métodos de tipagem bacteriana são ferramentas importantes nas investigações epidemiológicas, pois permitem elucidar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), e auxiliam na adopção de medidas preventivas para controlo do agente patogénico. Para a indústria de alimentos, a grande contribuição dos métodos de subtipagem é a possibilidade de traçar a origem da contaminação do produto final, verificar a disseminação da contaminação e determinar os pontos de persistência de microrganismos patogénicos na linha de produção, permitindo a correção, adequação ou implementação de procedimentos operacionais de higienização mais adequados (Borges *et al.*, 2009)

A detecção e o isolamento de *L. monocytogenes* nos alimentos permanece uma questão complexa, pela dificuldade de se eleger um método capaz de detectar e enumerar este microrganismo nas amostras num prazo de resposta útil. Na metodologia convencional, muitos dos enriquecimentos e meios de isolamento utilizados não permitem a recuperação e/ou a multiplicação de células danificadas frequentemente presentes em alimentos submetidos a tratamentos físicos e químicos. Os métodos rápidos de detecção e identificação de *L. monocytogenes* têm surgido como uma tentativa de encontrar soluções para estes, permitindo o rastreio de amostras negativas em poucos dias o que constitui um útil atributo no controlo de qualidade das agro-indústrias. Por outro lado, os métodos moleculares são muito sensíveis permitindo detectar números reduzidos de microrganismos, atenuando o efeito que decorre das possíveis interferências da matriz do alimento na composição dos meios de cultura como se verifica nos métodos convencionais. A discriminação das estirpes de *L. monocytogenes* ao nível da subespécie é bastante utilizada em investigações epidemiológicas recorrendo-se habitualmente a metodologias convencionais (serotipagem e fagotipagem). Cada vez

mais são usados métodos de tipagem molecular porque permitem caracterizar a totalidade do espectro dos isolados, conferindo um elevado poder de discriminação a alguns destes métodos (Guerra, 2003).

Os métodos de tipagem fenotípicos e moleculares permitem a diferenciação de *Listeria monocytogenes* a nível da espécie e subespécie. Os métodos de tipagem bacterianos não só melhoram a capacidade para detectar e rastrear focos de listeriose humana, mas também fornecem ferramentas para controlar as fontes de contaminação de *L. monocytogenes* em todo o sistema alimentar. A utilização de métodos de tipagem também fornece uma oportunidade para entender melhor a genética populacional, epidemiologia e ecologia de *L. monocytogenes*. Nos últimos anos tem havido grandes avanços no desenvolvimento de métodos moleculares mais sensíveis, rápidos, fáceis de usar e automatizados para a tipagem de *L. monocytogenes* (Wiedmann, 2002).

4.1 Métodos fenotípicos

Os métodos fenotípicos baseiam-se em fenómenos bioquímicos, fisiológicos e biológicos (Alves, 2003).

Face ao comportamento atípico de algumas estirpes, tem sido reavaliada a utilização de métodos fenotípicos para a taxonomia, que em geral diferem numa ou mais provas. É importante a variabilidade existente entre uma mesma espécie para determinada característica, o que dificulta o posicionamento taxonómico de determinadas espécies bacterianas (Gasarov *et al.* 2005).

Deve-se levar em consideração, ainda, que na maioria dos testes fenotípicos pode ocorrer variabilidade de resultados, com a ocorrência de resultados falso-negativos,

reflexo da ação de factores ambientais sobre a expressão génica, conforme descrevem Farber *et al.* (2001).

Diversos autores afirmam que métodos tradicionais de pesquisa de *L. monocytogenes* são demorados e pouco específicos, além de não permitir a identificação do patógeno quando em baixas contagens na amostra. Embora não possam ser totalmente abolidos, os métodos convencionais vêm sendo cada vez mais substituídos pelos métodos moleculares, face ao seu grau de especificidade, rapidez e reprodutibilidade (Vasquez-Boland *et al.* 2001; Byun *et al.* 2001; Allerberger, (2002); Beumer *et al.* 2003; Wagner e Allerberger 2003; Aguado *et al.* 2004; Gasanov *et al.* 2005).

4.1.1 Serotipagem

A serotipagem é uma ferramenta clássica de tipagem baseada num esquema descrito por Seeliger & Hoehne (1979), baseada em antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Até ao momento foram classificados 17 serotipos de *Listeria*; 13 dos quais correspondentes a *L. monocytogenes* (Quadro 5). Existem dados epidemiológicos que evidenciam a associação entre a composição antigénica e a patogenicidade de *L. monocytogenes* visto que 3 serotipos apenas (1/2a, 1/2b, e 4b) são responsáveis por mais de 95% dos casos de listeriose humana (Jacquet *et al.*, 2002). Dentro deste contexto, a serotipagem tem um valor epidemiológico muito reduzido (Schuchat *et al.*, 1991). É apropriada para analisar um grande número de estirpes, por exemplo durante epidemias, mas pela fraca capacidade discriminatória é necessário uma tipagem posterior por outros métodos (Schönberg *et al.*, 1996).

Quadro 5 - Serotipos associados a diferentes espécies de *Listeria*

Espécies	Serovares
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	3, 6a, 6b, 4ab
<i>L. welshimeri</i>	1/2a, 4c, 6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b

Adaptado de Larpent (1995)

4.1.2 Fagotipagem

A fagotipagem permite a distinção entre estirpes pertencentes a um mesmo serogrupo, ou mesmo serotipo, mas é frequente a existência de estirpes não tipáveis. Baseia-se na utilização de um conjunto de fagos líticos específicos para a estirpe sensível, provocando-lhe a sua lise ou destruição (Graves *et al.*, 1999). A principal limitação do seu uso é a exigência de laboratórios altamente especializados, dificultando assim o seu emprego rotineiro (Holko *et al.*, 2002; Gasanov *et al.*, 2005).

4.2 Métodos genotípicos

O desenvolvimento de métodos moleculares conheceu grandes avanços nos últimos anos, abrindo novas possibilidades nos campos da classificação, identificação, filogenia, evolução e diagnóstico.

Qualquer método de tipagem genética deve permitir a diferenciação clara de estirpes, e principalmente, deve ter uma elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos moleculares de tipagem são igualmente eficazes, diferindo nomeadamente na capacidade discriminatória em diferentes níveis taxonómicos (Figura 3). Como tal, a

escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida (Alves *et al.*, 2003).



Figura 3 - Capacidade discriminatória de diferentes métodos de tipagem genética de microrganismos

Fonte: Alves *et al.*, 2003

A eficácia dos métodos moleculares aplicados à tipagem de *L. monocytogenes* tem melhorado a capacidade de identificação e discriminação entre os subtipos ao longo dos anos. A aplicabilidade dos métodos moleculares nos estudos epidemiológicos relaciona-se com a possibilidade de tipagem das culturas, o poder de discriminação, a precisão, a facilidade de execução da técnica, o custo, o tempo e a interpretação dos resultados (Olive & Bean, 1999).

Embora um método particular de tipagem possa ter elevado poder discriminatório e boa reprodutibilidade, a sua complexidade na execução e na interpretação dos resultados, assim como os custos envolvidos na sua implementação e utilização, podem estar para além da capacidade do laboratório. Portanto, a escolha de um método irá depender das necessidades, capacidade e recursos do laboratório.

Os métodos moleculares que têm sido testados com o objectivo de serem aplicados na tipagem de *L. monocytogenes* são: MEE (*Multilocus Enzyme Electrophoresis*); PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*); RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*); RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*); REA (*Restriction Endonuclease Analysis*); Ribotipagem; PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Graves *et al.*, 1999); AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Guerra *et al.*, 2002).

4.2.1 Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP

Segundo Savelkoul *et al.* (1999) e Keto-Timonen (2008), um dos métodos mais recentes e promissores é o *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Este método, que foi originalmente patenteado e descrito por Zabeau & Vos (1993) e Vos *et al.* (1995) para a caracterização de espécies vegetais, pode no entanto ser utilizado para a análise de DNA de qualquer origem, incluindo o DNA de animais, plantas, nematóides, protozoários, fungos e bactérias (Janssen *et al.* 1996, Savelkoul *et al.* 1999, Blears *et al.* 2000, Borst *et al.* 2003, Ball *et al.* 2004, Bensch & Åkesson 2005, Mikkonen *et al.* 2005, Sharma *et al.* 2006, de Valk *et al.* 2007, citados por Keto-Timonen, 2008).

O método AFLP tem muitas aplicações no campo da microbiologia. É hoje amplamente utilizado para a tipagem e classificação de estirpes e vários estudos têm utilizado AFLP em investigações epidemiológicas de surtos. O método também pode ser usado para controlar as fontes de contaminação, a sobrevivência e a propagação da contaminação bacteriana ao nível da exploração, em matadouros e em unidades de processamento de alimentos (Vogel 2001 ; Johnsen *et al.*, 2006). Além disso, o AFLP foi usado para estudar a diversidade microbiana de ecossistemas contaminados (La Rosa *et al.*, 2006, citados por Keto-Timonen, 2008) e tem sido aplicado com sucesso à tipagem de *L.*

monocytogenes (Guerra *et al.*, 2002; Keto-Timonen *et al.*, 2003; Pintado, 2005; Keto-Timonen, 2008).

4.2.1.1 Princípio do método AFLP

AFLP é um método molecular de recolha de “impressões digitais” (*figerprinting*) de DNA, baseado na amplificação selectiva de fragmentos de DNA gerados pela digestão com enzimas de restrição (Vos *et al.*, 1995).

O método original de AFLP, tal como demonstra a Figura 4, envolve as seguintes etapas:

- (1) O DNA previamente extraído é digerido com duas enzimas de restrição, uma de corte raro (ex. *EcoRI*) e outra de corte frequente (ex. *MseI* ou *TaqI*), resultando centenas de fragmentos de restrição;
- (2) Cada fragmento resultante é ligado, nas duas extremidades de restrição, a adaptadores oligonucleotídicos de cadeia dupla, complementares às extremidades de restrição e concebidos para que os locais de corte não sejam restaurados após a ligação, evitando que ocorram novas digestões;
- (3) Segue-se a amplificação PCR dos fragmentos de restrição sob estritas condições para permitir a ligação aos *primers*. Os *primers* usados para amplificação contêm sequências de DNA complementares às sequências de oligonucleótidos dos adaptadores;
- (4) Os fragmentos resultantes são separados por electroforese em gel de agarose, obtendo-se um padrão com elevada informação de 20 a 400 bandas (Savelkoul *et al.*, 1999);
- (5) Os perfis de bandas obtidos a partir do gel são analisados visualmente ou através de *software* informático.

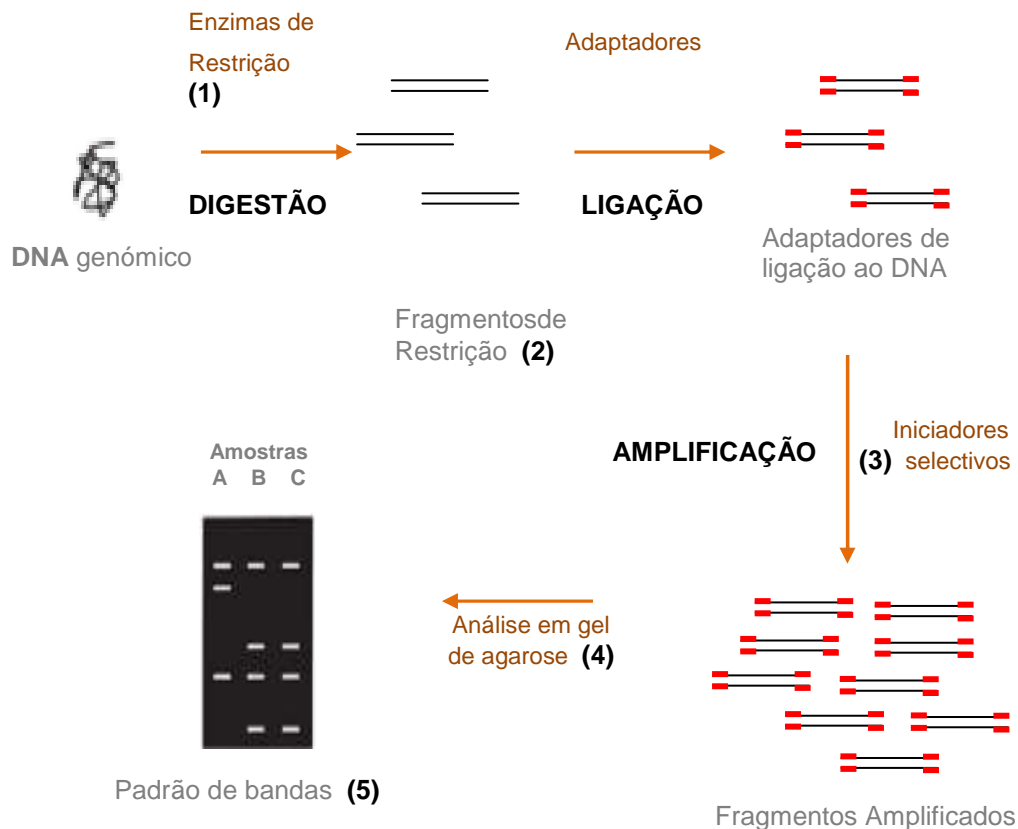


Figura 4 – Esquema que resume as quatro etapas do método AFLP
(Adaptado de Blears *et al.*, 1998)

4.2.1.2 Modificações do método original AFLP

- **AFLP com uma enzima**

O DNA é digerido só com uma enzima de restrição (Figura 5). Depois da digestão, o local de restrição dos fragmentos liga-se ao adaptador específico e é realizado o PCR usando um único primer (Valsangiacomo *et al.* 1995). A maioria dos protocolos estabelecidos utiliza iniciadores tendo um nucleotídeo selectivo. Após a amplificação, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose e corados com brometo de etídio (Valsangiacomo *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1999; Ripabelli *et al.*, 2000; McLauchlin *et al.*, 2002; Jaimes *et al.*, 2006). Os fragmentos, num intervalo de dimensão adequada, são

seleccionados para análise numérica. Normalmente, os pequenos fragmentos (200-400 bp) e os fragmentos de maior dimensão (superior a 1300-2000 bp) são removidos da análise (McLauchlin *et al.*, 2000; Ripabelli *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2002; Jaimes *et al.*, 2006). O número de fragmentos analisados varia entre 3 e 33 (Gibson *et al.*, 1999, Ripabelli *et al.*, 2000 ; McLauchlin *et al.*, 2000; Jaimes *et al.*, 2006).

Comparado com o método AFLP original (onde são usadas duas enzimas), o AFLP que usa apenas uma enzima de restrição (uAFLP) conduz a um menor número de fragmentos, gerando, portanto, menos informação genética. Com o método em que se usa uma só enzima (uAFLP), os fragmentos amplificados são detectados directamente em gel de agarose, tornando uAFLP mais fácil de executar do que, por exemplo, a análise de alguns protocolos de RFLP (Valsangiacomo *et al.*, 1995) ou ribotipagem (McLauchlin *et al.*, 2000). Além disso, uAFLP é fácil de executar e os equipamentos necessários são baratos e largamente disponíveis em comparação com o necessário para PFGE (Ripabelli *et al.*, 2000; Champion *et al.*, 2002). O método uAFLP também é menos trabalhoso e requer menos mão-de-obra e tempo do que o PFGE (Champion *et al.*, 2002), podendo obter-se resultados no prazo de 24 h (Boerema *et al.*, 2006). Se um número limitado de perfis uAFLP é comparado, por exemplo numa situação de surto, os padrões podem ser analisados visualmente (Ripabelli *et al.*, 2000). No entanto, a análise assistida por computador é necessária quando são realizadas comparações durante longos períodos (Ripabelli *et al.*, 2000).

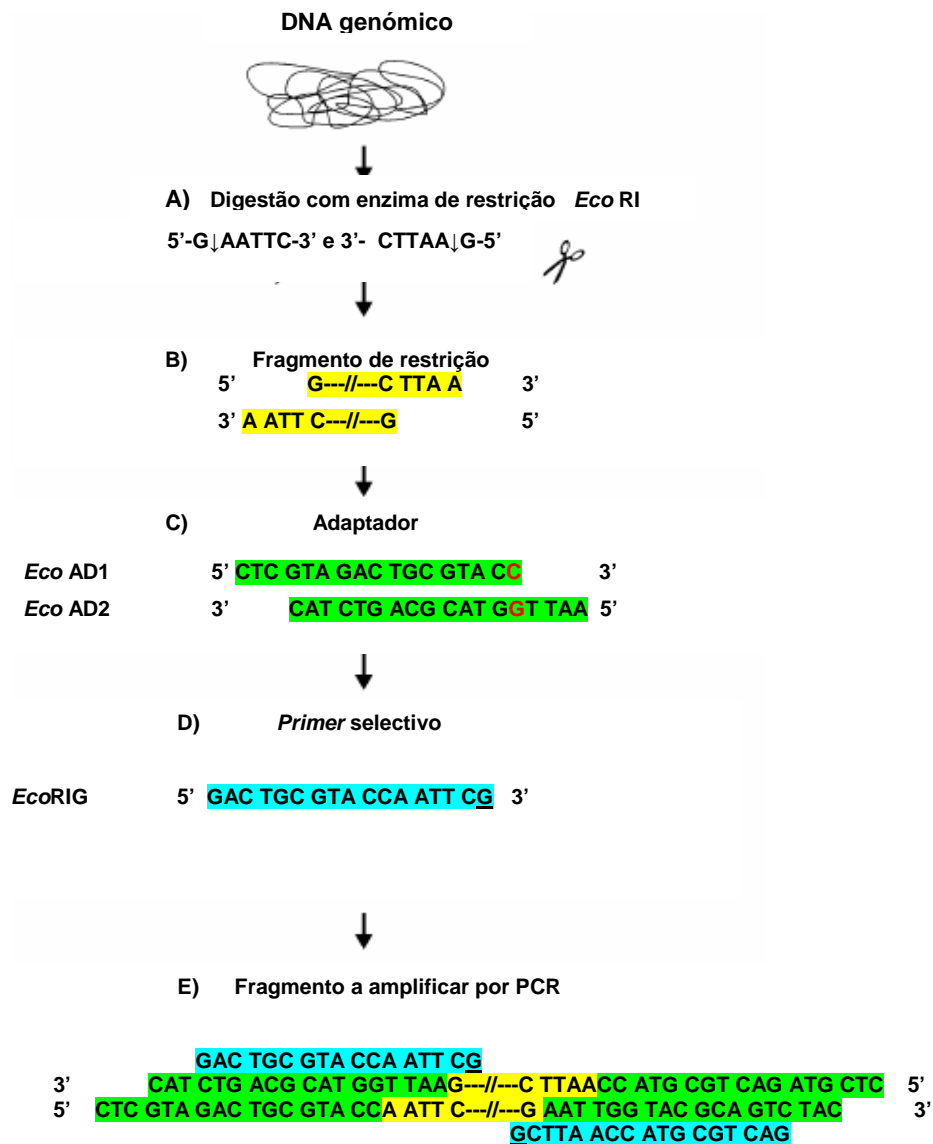


Figura 5- Esquema representativo do método AFLP com a enzima de restrição *Eco* RI usada na tipagem de *L. monocytogenes*.

(A) A enzima de restrição *Eco* RI corta o DNA nos locais de restrição, indicados pela seta. (B) Fragmento de restrição obtido após a digestão com *Eco* RI. (C) Adaptador, constituído por duas sequências de oligonucleótidos complementares, que se vai ligar a cada extremidade do fragmento de restrição. Os nucleótidos a vermelho são bases inseridas no adaptador para eliminar a restrição deste local após a ligação. (D) *Primer* utilizado para reacção de amplificação. O nucleótido sublinhado é a base selectiva inserida no *primer*. (E) Fragmento pronto a ser amplificado numa reacção PCR.

(Adaptado de Gibson *et al.* (1998); Savelkoul *et al.* (1999); Guerra (2003) e Pintado (2009))

- **Análise de padrões AFLP**

Diferenças nos perfis de AFLP provenientes de estirpes diferentes surgem de inserções ou exclusões dentro dos fragmentos amplificados e de mutações nos locais de restrição ou nas sequências adjacentes aos sítios de restrição e complementar das extensões ao primer selectivo (Savelkoul *et al.*, 1999).

A escolha de uma enzima de restrição adequada e a combinação do *primer* é importante para se conseguir um número suficiente de bandas polimórficas (Valsangiacomo *et al.*, 1995; Lan & Reeves, 2002).

Existem várias formas de realizar a análise de perfis de AFLP. As duas mais frequentemente utilizadas são as técnicas para calcular as semelhanças entre os perfis AFLP usando o coeficiente de correlação de **Dice** (Dice, 1945) e o coeficiente de correlação de **Pearson** (Pearson, 1926). Enquanto o coeficiente de correlação de **Dice** se baseia na presença ou ausência de bandas e, portanto, a atribuição destas é necessário (De Boer *et al.*, 2000), o coeficiente de correlação de **Pearson** mede a totalidade da curva densitométrica do perfil, sem necessidade de atribuição prévia de bandas. Uma desvantagem da análise baseada na definição de bandas é que a atribuição da banda pode ser muito trabalhosa, devido aos complexos perfis de AFLP que podem ser obtidos (De Boer *et al.*, 2000). Além disso, a análise baseada na definição de bandas está sujeita a erros de interpretação humana. Outros factores interferem, como a realização da análise por técnicos diferentes e a presença de bandas muito semelhantes (Torpdahl *et al.*, 2005). Estas limitações podem fazer com que a comparação dos resultados da análise AFLP entre laboratórios seja difícil (Torpdahl *et al.*, 2005).

É também essencial lembrar que, embora o software de computador seja parcialmente automatizado, as configurações seleccionadas podem afectar o resultado de duas

análises. As configurações seleccionadas devem, portanto, ser mantidas constantes durante todo o estudo (De Boer *et al.* 2000).

- **Pontos fortes e fracos de AFLP**

O método AFLP pode ser aplicado ao DNA de qualquer origem e complexidade, sem necessidade do conhecimento prévio sobre o DNA-alvo (Vos *et al.*, 1995). Além disso, a análise de AFLP reflete a totalidade do genoma do organismo e os fragmentos amplificados originam ambas as variáveis e sequências de DNA conservadas (Arnold *et al.*, 1999). O poder discriminatório de AFLP demonstrou ser elevado em diversos estudos. Um conjunto padrão de reagentes podem ser aplicados a diferentes espécies de bactérias, sem a necessidade de informação específica da espécie (Jackson *et al.*, 1999). O poder discriminatório de AFLP pode ser controlado pela selecção da enzima de restrição e pelos *primers* utilizados (Desai *et al.*, 2001). A análise de AFLP é relativamente insensível às diferenças nas concentrações de DNA. Vos *et al.* (1995) demonstraram que concentrações de DNA que variaram 1000 vezes, a partir de 25 pg e 25 ng, tiveram pouco efeito sobre os padrões de AFLP. No entanto, com uma concentração de DNA muito baixa, de 2,5 pg, as diferenças na intensidade das bandas foram observadas e algumas bandas estavam ausentes.

Em contraste com o RAPD, que tem uma baixa reprodutibilidade (Power, 1996), o AFLP usa condições muito rigorosas e, portanto, a sua **reprodutibilidade** é boa. Vários estudos têm demonstrado que experiências em duplicado resultaram em perfis AFLP idênticos (Janssen *et al.*, 1996). Muitos autores, no entanto, observaram pequenas variações na intensidade dos fragmentos (Jackson *et al.* 1999; Hong *et al.*, 2005). Variações na altura do pico não afectou os números ou tamanhos dos produtos de PCR. Esta variação é devida a pequenas diferenças no perfil e intensidades de ruído de fundo

ou alturas de pico, o que pode decorrer de diferenças na eficácia da digestão-ligação ou etapas de amplificação PCR (Lindstedt *et al.*, 2000) bem como de pequenas diferenças na quantidade de amostra carregadas no gel (Ticknor *et al.*, 2001). O grau de similaridade dos perfis obtidos por AFLP em ensaios de repetição levados a cabo em vários estudos variou entre 84% e 99%, após análise com o coeficiente de correlação de Pearson (Janssen *et al.*, 1997; Wieland *et al.* 2006, Keller *et al.* 2007 citados por Keto-Timonen, 2008).

O grande desafio da maioria dos métodos de tipagem, incluindo a análise de AFLP, é a reprodutibilidade interlaboratorial (Brisse *et al.*, 2002).

Diversos autores consideram o método Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) como o melhor método para a tipagem bacteriana, no entanto, vários estudos têm mostrado que o poder discriminatório do AFLP é igual ou superior ao obtido com o PFGE. A análise de AFLP é mais rápida do que a análise PFGE e ao método pode ser parcialmente automatizado, reduzindo assim o tempo exigido para a obtenção dos resultados (Duum *et al.*, 1999; Grady *et al.*, 1999).

A principal fonte de ambiguidade na comparação de perfis AFLP é a variação da intensidade das bandas, a qual é provavelmente devida a diferenças na eficiência da amplificação (Savelkoul *et al.*, 1999).

Poder discriminatório – O método molecular AFLP pode ser utilizado tanto na identificação como na tipagem de microrganismos. Para a análise da similaridade entre perfis obtidos por AFLP, recomenda-se a utilização dos seguintes intervalos de similaridade: perfis com 90 a 100% de homologia devem ser considerados como provenientes de estirpes idênticas; perfis com 90 a 60% de homologia devem ser

considerados como provenientes de diferentes estirpes da mesma espécie; perfis com 40 a 60% de homologia devem ser considerados como provenientes de isolados do mesmo gênero, mas de espécies diferentes; perfis com menos de 40% de homologia devem ser considerados como provenientes de isolados de diferentes gêneros (Savelkoul *et al.*, 1999).

Tipabilidade - Uma característica única do método AFLP é que pode ser aplicado ao DNA de qualquer organismo (Savelkoul *et al.*, 1999).

4.2.2 Comparação do AFLP com outros métodos utilizados na tipagem de *L. monocytogenes*

A maior parte dos métodos são bastantes laboriosos, como o caso do método PFGE, e difíceis de reproduzir entre diferentes ensaios, como é o caso do RAPD (Aarts *et al.*, 1999). O método PFGE tem um elevado poder de discriminação e reprodutibilidade, verificando-se muito útil na subtipagem do serovar 4b. Alguns autores consideram que o método RAPD tem necessidades de padronização devido à inconsistência da reprodutibilidade dos perfis (Graves *et al.*, 1999).

A serotipagem continua a ser utilizada como um método de primeira linha, permitindo a comparação de resultados de diversos estudos. Contudo, apresenta um baixo poder de discriminação quando comparado com outros métodos de tipagem (Batt, 1999).

O método RFLP permite a determinação completa e inequívoca do genótipo, permitindo distinguir em organismos diplóides os homozigóticos dos heterozigóticos, contudo é um método moroso e trabalhoso, sendo necessário DNA em grande quantidade e com boa

qualidade (Nuez & Carrillo, 2000). Embora a ribotipagem se correlacione bem com outros métodos de tipagem molecular, é o método menos discriminatória (Graves *et al.*, 1999).

O método AFLP é robusto, reprodutível e discriminatório (Vos *et al.*, 1995), conjuga a utilização de enzimas de restrição com a técnica de PCR para a obtenção de um perfil genómico. O número de fragmentos gerados é suficientemente grande para permitir a detecção de polimorfismos entre indivíduos pertencentes à mesma espécie ou estirpe, mas suficientemente pequeno para ser relativamente fácil de interpretar (Jansen *et al.*, 1996).

5. Enquadramento geral e objectivos

Como já foi referido, a listeriose é uma zoonose cuja principal origem é a ingestão de alimentos contaminados. Sabe-se que quase todos os alimentos podem transmitir *Listeria monocytogenes*, contudo, a informação disponível sugere a existência de alimentos mais perigosos que outros. Os queijos de pasta mole ou semi-mole, elaborados com leite cru e que são durante o seu processo de fabrico muito manipulados são considerados alimentos de alto risco (ILSI, 2005), uma vez que são um alimento pronto-a-comer, requerem refrigeração, são conservados durante longos períodos, têm potencial para sofrer contaminação por *L. monocytogenes* e suportam a multiplicação desta bactéria em grandes números.

Os produtos lácteos em geral, e os queijos em particular, têm estado na origem de surtos de listeriose na Europa e nos Estados Unidos da América. Em Portugal, apesar de não haver registos de listeriose, está reportada uma elevada incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos nacionais, a maioria dos quais elaborados com leite cru (Duarte, 1992; Pintado, 1996; Guerra & Bernardo, 1997). Sabe-se também que os serotipos associados às estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de queijos nacionais são maioritariamente pertencentes ao serotipo 4b (Pintado *et al.*, 2005), o qual está referido na literatura como o responsável pelo maior número de casos de listeriose.

Tendo em conta a importância de que se revestem as estirpes de *L. monocytogenes* serotipo 4b, pelas razões apresentadas atrás, a sua caracterização usando métodos mais discriminatórios que a serotipagem é de crucial importância, uma vez que permite estudar as suas relações de similaridade e, eventualmente, associar a sua presença a regiões geográficas distintas.

Dados anteriores, obtidos por Pintado (2005), mostraram que a tipagem molecular por AFLP permitia a divisão dos isolados (de diferentes origens e datas de isolamento) de acordo com o seu serotipo, sendo possível prever o serotipo a partir do conhecimento do perfil AFLP obtido. No âmbito do mesmo estudo, os dados sugeriam uma distribuição geográfica dos tipos AFLP. Foi neste contexto que foi delineado o trabalho de mestrado que agora se apresenta, intitulado “Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* ser. 4b por *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)”.

A primeira fase do trabalho teve por objectivos a optimização do método de tipagem AFLP, anteriormente implementado na Escola Superior Agrária de Castelo Branco, e testar a sua reprodutibilidade intra e interlaboratorial com um conjunto de estirpes de *L. monocytogenes* de perfil AFLP conhecido, tendo em conta as novas condições de ensaio optimizadas.

A segunda fase do trabalho teve por objectivos efectuar a caracterização molecular de 47 estirpes de *Listeria monocytogenes* ser. 4b, isoladas de queijos elaborados com leite cru produzidos em diferentes regiões do país, bem como comparar os perfis AFLP obtidos tendo em conta a sua origem geográfica. Para a concretização deste último objectivo foi usada não só informação obtida da tipagem destes 47 isolados mas também informação anteriormente recolhida da tipagem molecular por AFLP de *L. monocytogenes* ser. 4b de queijos das regiões de Castelo Branco e Tolosa, de forma a avaliar de forma mais exhaustiva a possível existência de uma distribuição geográfica dos tipos moleculares de *L. monocytogenes* ser. 4b em função do tipo de queijo.

II. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do trabalho foi realizada no Laboratório de Microbiologia e no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, estando inicialmente previsto estudar um conjunto de isolados de *L. monocytogenes* obtidos de diferentes tipos de queijos de zonas distintas do país e proceder à sua tipagem através do método AFLP. Apesar das diligências não foi conseguido, em tempo útil, reunir um conjunto representativo de isolados de todas as principais zonas produtoras de queijos elaborados com leite cru do país. O método AFLP foi aplicado de acordo com o protocolo, em funcionamento na *Health Protection Agency* (HPA), em Londres, em que só é usada a enzima de restrição *EcoRI* (FPRU, 2003 f; Pintado, 2005).

1. Isolados bacterianos

Neste estudo foram avaliados 47 isolados de *Listeria monocytogenes*, sendo 44 provenientes de queijo de ovelha curado de pasta semi-mole da região produtora de queijo da Serra da Estrela, 2 de queijo de vaca curado, de pasta dura, da região de São Jorge (Açores) e 1 de queijo de ovelha curado de pasta semi-mole da região produtora de queijo Serpa (Alentejo). Foi também usada uma estirpe de *L. monocytogenes* serotipo 4b, isolada de um caso de listeriose humana, associado ao consumo de queijo, da *National Collection of Typical Cultures*, HPA, UK (NCTC 11994), que funcionou como controlo positivo (Quadro 6).

Os 44 isolados provenientes da região de produção de queijo Serra da Estrela, assim como a estirpe de referência, foram cedidos pelo Instituto Superior de Agronomia (ISA) e fazem parte da sua colecção de culturas. Foram recolhidos em explorações produtoras

de queijo, entre os meses de Abril de 2002 e Maio de 2004. Todos estes isolados tinham já sido serotipados e identificados como serovar 4b.

Quanto aos isolados de queijo provenientes das regiões de produção de queijo de São Jorge e de Serpa; estes foram cedidos pelo Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação (INETI).

Quadro 6 - Isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de queijos de ovelha (das regiões da Serra da Estrela e Serpa) e de vaca (da região de São Jorge, Açores) elaborados com leite cru

Referência	Região de origem	Data de isolamento	Serotipo
ISA 3069	Serra da Estrela	09-04-02	4b
ISA 3072	Serra da Estrela	16-04-02	4b
ISA 3074	Serra da Estrela	16-04-02	4b
ISA 3076	Serra da Estrela	16-04-02	4b
ISA 3077	Serra da Estrela	16-04-02	4b
ISA 3086	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3087	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3088	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3089	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3090	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3091	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3092	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3093	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3094	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3095	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3096	Serra da Estrela	18-06-02	4b
ISA 3097	Serra da Estrela	18-06-02	4b
ISA 3098	Serra da Estrela	18-06-02	4b
ISA 3099	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3100	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3101	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3102	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3103	Serra da Estrela	09-07-02	4b
ISA 3104	Serra da Estrela	09-07-02	4b
ISA 3105	Serra da Estrela	09-07-02	4b
ISA 3106	Serra da Estrela	09-07-02	4b
ISA 3169	Serra da Estrela	28-05-02	4b
ISA 3176	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3177	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3178	Serra da Estrela	04-06-02	4b
ISA 3219	Serra da Estrela	26-11-02	4b
ISA 3220	Serra da Estrela	26-11-02	4b
ISA 3225	Serra da Estrela	26-11-02	4b
ISA 3245	Serra da Estrela	26-11-02	4b
ISA 3246	Serra da Estrela	26-11-02	4b
ISA 3251	Serra da Estrela	04-12-02	4b
ISA 3286	Serra da Estrela	21-01-03	4b
ISA 3326	Serra da Estrela	21-01-03	4b
ISA 3444	Serra da Estrela	19-02-03	4b
ISA 3445	Serra da Estrela	19-02-03	4b
ISA 3446	Serra da Estrela	19-02-03	4b
ISA 3449	Serra da Estrela	19-02-03	4b
ISA 3450	Serra da Estrela	19-02-03	4b
ISA 3971	Serra da Estrela	01-05-04	4b
INETI 405	Serpa	(1)	4b?
INETI 833	São Jorge	(2)	4b?
INETI 1375	São Jorge	(2)	4b?

(1) – Não é conhecida a data de isolamento; (2) – Não são conhecidas as datas de isolamento; apenas se sabe que foram isoladas em queijarias e em épocas distintas

2. Confirmação da pureza e características culturais dos isolados

As culturas de *L. monocytogenes* chegaram ao laboratório de Microbiologia crescidas em placas de *Tryptone Soya Agar* (TSA) e acondicionadas em mala isotérmica, a uma temperatura de refrigeração. As placas foram observadas à lupa de modo a confirmar o crescimento característico e a ausência de contaminações, após o que foi seleccionada uma única colónia para meio TSA (refª BK047 – BioKar Diagnostics, França), para posterior confirmação das características da espécie *L. monocytogenes* em Gelose chromID™ Ottaviani Agosti (OAA) (refª 43 641 - bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Figura 6) e detecção de β -hemólise em Gelose Columbia + 5 % sangue carneiro (refª 43 041 - bioMérieux® SA, Marcy L'Étoile, França) (Figura 7). Todas as placas foram incubadas a 37°C durante 24h.



Figura 6 - Comportamento característico de alguns isolados de *L. monocytogenes* em meio selectivo OAA

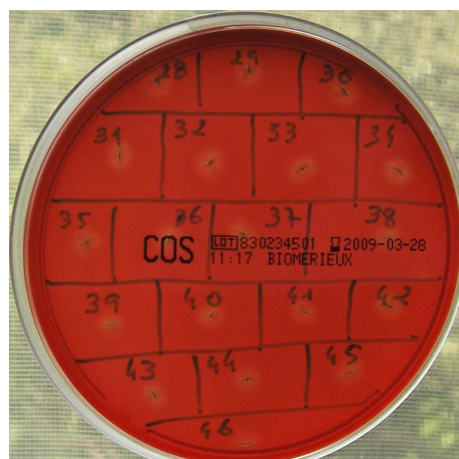


Figura 7 - Reacção de β - hemólise de alguns isolados de *L. monocytogenes* no meio de cultura Gelose Columbia com 5% de sangue de carneiro

Confirmada a pureza e as características da espécie *L. monocytogenes*, os isolados foram cultivados em caldo de *Tryptone Soya* (refª CMO129 – Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), adicionado de glicerol (15% v/v) (refª 1.04092 – Merck, Darmstadt, Alemanha) com vista à sua conservação a -80°C e novamente em gelose TSA, para a obtenção de cultura pura e jovem, a fim de se proceder à extracção de DNA.

3. Extracção de DNA

A obtenção de DNA genómico de boa qualidade e quantidade é factor crucial para o sucesso de qualquer método de tipagem molecular e os *kits* comerciais fornecem excelentes resultados para a amplificação do DNA de bactérias Gram + e Gram - (Nogueira *et al.*, 2004).

A extracção de DNA das células de *L. monocytogenes* foi realizada com recurso ao kit *Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation - DiversiLab™* (BioMérieux, USA; Figura 8), recomendado para a extracção de DNA genómico a partir de culturas microbianas, tendo sido executado segundo as instruções do manual.



Figura 8 - Kit de extracção de DNA , *Mo Bio UltraClean Microbial DNA isolation- DiversiLab™* (BioMérieux, USA)

Assim, para a extracção de DNA recolheu-se, com uma ansa de inoculação, o equivalente a 10 µl de células bacterianas, de culturas puras e jovens, para um tubo *microbead*, contendo 300 µl de solução *microbead*. A este adicionou-se 50 µl da solução MD1 e homogeneizou-se no Vortex (*Thermolyne Maxi Mix II*) durante 10 minutos à velocidade máxima. Após homogeneização procedeu-se à centrifugação do tubo durante

30 segundos à velocidade de 10000 *g* (\approx 12320 rpm) em centrífuga (Heraeus, Biofuge 28RS).

Num novo microtubo de 2,0 ml, pipetou-se 100 μ l da solução MD2 e transferiu-se o sobrenadante do passo anterior. Homogeneizou-se em Vortex e incubou-se durante 1 hora à temperatura de 4 °C. Após a incubação o microtubo com a suspensão foi centrifugado a 10000 x *g* durante 1 minuto.

Para um novo microtubo pipetou-se 450 μ l da solução MD3 e transferiu-se 200 μ l do sobrenadante, resultante da centrifugação anterior. Seguiu-se uma breve agitação em Vortex e inversão do microtubo.

Transferiu-se 650 μ l da solução obtida no passo anterior, para o microtubo *spin filter* seguida de centrifugação a 10000 x *g* durante 30 segundos. Eliminou-se o sobrenadante e recolocou-se o filtro no mesmo microtubo. Para o microtubo *spin filter*, pipetou-se 300 μ l da solução MD4, centrifugou-se a 10000 x *g* durante 30 segundos e eliminou-se o sobrenadante. Recolocou-se o filtro no mesmo microtubo e centrifugou-se novamente a 10000 x *g* durante 60 segundos e eliminou-se o microtubo e o sobrenadante. Colocou-se o *spin filter* num microtubo novo de 2,0 ml, pipetou-se 35 μ l da solução MD5 e centrifugou-se a 10000 x *g* durante 30 segundos. Eliminou-se o *spin filter* e guardou-se o sobrenadante, que contém DNA bacteriano extraído, a -20 °C.

O protocolo detalhado e a função das soluções constantes do Kit relativo à extração de DNA encontram-se no Anexo I.

4. Método *Amplified Fragment Length Polymorphisms* – AFLP, usando a enzima *EcoRI*

Após a extracção de DNA dos isolados de *L. monocytogenes* em estudo, foi aplicado o método AFLP com os seguintes passos (Figura 9):

- 1) Digestão do DNA de *L. monocytogenes* com a enzima de restrição *EcoRI*;
- 2) Ligação dos adaptadores *Eco AD1* (10 μ M) e *Eco AD2* (10 μ M) (Quadro 7);
- 3) Amplificação dos fragmentos de DNA ligados aos adaptadores com a utilização do *primer EcoRIG* (10 μ M) (Quadro 8);
- 4) Separação por electroforese em gel de agarose e observação dos fragmentos amplificados.

Extracção de DNA

Extrair DNA bacteriano (incluindo estirpe de referência, para usar no controlo positivo)

Digestão de ADN com Eco RI e ligação dos adaptadores

Tubo PCR de 200 µl

5 µl de amostra de DNA bacteriano +
35 µl de **Mastermix**

Mastermix*

Reagentes (concentração)	Volume	Concentração final
Água ultra pura	12 µl	
5x T4 DNALigase Buffer	4 µl	0,5x
EcoAD1 (10 µM)	4 µl	1 µM
EcoAD2 (10 µM)	4 µl	1 µM
EcoR1 (10U/µl)	10 µl	2,5U/µl
T4 DNALigase (1U/µl)	1 µl	0,025U/µl
Total	35µl	

Nº de reacções = (nº de amostras + Controlo positivo (*L.monocytogenes* de referência) + controlo Negativo)

Fechar tubos, homogeneizar e colocar no termociclador, fazendo-se a incubação a 37°C durante 90 minutos, seguida de inactivação da enzima a 80°C durante 10 minutos e depois o arrefecimento a 4°C

5µl de DNA digerido e diluído

Tubo PCR de 200 µl
8 µl de água ultra pura
+
2 µl de DNA digerido

Tubo *PuRe Taq Ready-to-Go-PCR Beads**
(contém: estabilizadores; BSA; dNTPs; Tampão reacção e 2,5 U de pure taq DNA Polimerase)

* Quando uma "pérola" (bead) é reconstituída com o volume total de 25µl, a concentração final de cada dNTP é 200µM em 10mM Tris -HCl (pH 9.0 à T ambiente), 60mM KCl e 1,5mM MgCl₂

Mistura PCR

Reagentes (concentração)	Volume	Concentração final
Água ultra pura	16,5 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	1 µl	2,0
EcoRI G primer (10U/µl)	2,5 µl	1µM
Total	20µl	

20 µl de Mistura PCR

Amplificação por Reacção de Polimerização em Cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR)

A mistura obtida é submetida a um processo de desnaturação inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos sucessivos com a seguinte sequência: 1 minuto a 94 °C para a desnaturação, 1 minuto a 60 °C para a ligação do primer e 2,5 minutos a 72 °C para a amplificação. O passo final é o arrefecimento a 4 °C.

Electroforese em gel de Agarose

Figura 9 -Fluxograma da metodologia para aplicação do método AFLP

Quadro 7 - Sequência de nucleótidos dos adaptadores e *primer* usados no método AFLP

Adaptador/ <i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Concentração usada
Adaptador: <i>Eco</i> AD1 ⁽¹⁾	5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC -3'	10µM
<i>Eco</i> AD2 ⁽¹⁾	5'- AAT TGG TAC GCA GTC TAC -3'	10µM
<i>Primer</i> : <i>Eco</i> R1G ⁽¹⁾	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CG -3'	10µM

(1) - Metabion International AG - Martinsried, Deutschland

A preparação dos adaptadores e *primer* é efectuada de acordo com as instruções do fabricante e encontra-se descrita no Anexo II.

4.1. Digestão de DNA com *Eco* RI e ligação dos adaptadores

Para a digestão do DNA, através da enzima de restrição *Eco*RI e ligação aos adaptadores prepararam-se tubos PCR da seguinte forma:

- Num tubo de 200 µl, colocou-se 5 µl de amostra de DNA bacteriano e 35 µl de *Mastermix* (Quadro 8) homogeneizando-se por pipetagem.
- Para um tubo PCR, destinado ao controlo negativo, pipetou-se 5 µl de água ultra pura (Gibco®), e 35 µl de volume de *Mastermix*.

Quadro 8 – Constituição do *Mastermix*

Reagentes (concentração)	Volume	Concentração final
Água ultra pura	12 µl	
5x T4 DNALigase Buffer	4 µl	0,5x
<i>Eco</i> AD1 (10 µM)	4 µl	1 µM
<i>Eco</i> AD2 (10 µM)	4 µl	1 µM
<i>Eco</i> R1 (10U/µl)	10 µl	2,5U/ µl
T4 DNALigase (1U/µl)	1 µl	0,025U/ µl
Total	35µl	

O *Mastermix*, com um volume final de 35 μ l, contém: 10 μ l de enzima de restrição *EcoRI* (10U/ μ l), 4 μ l de 5xT4DNA *ligase buffer*, Invitrogen, 4 μ l de *EcoAD1* (10 μ M), 4 μ l de *EcoAD2* (10 μ M), 1 μ l de T4 DNA Ligase (1U/ μ l) (Invitrogen) e 12 μ l de água ultra pura (Gibco®).

O número total de tubos está relacionado com o número de amostras mais dois, que corresponde ao controlo negativo mais o controle positivo (com a estirpe NCTC). Convém contar com mais dois ou três volumes para compensar eventuais perdas ou erros de pipetagem.

- Os tubos com as amostras foram colocados num termociclador (Biometra, *TGradiente*), (Figura 10) fazendo-se a incubação a 37 °C durante 90 minutos, seguida de inactivação da enzima a 80 °C durante 10 minutos e depois o arrefecimento a 4 °C.



Figura 10 - Termociclador Biometra, *Tgradient*

4.2. Amplificação dos fragmentos de restrição por Reacção de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

Para a reacção de amplificação procedeu-se à diluição do DNA digerido e ligado e à preparação da mistura PCR.

- A diluição do DNA digerido foi efectuada através da adição de 8 µl de água ultra pura (Gibco®) e 2 µl de DNA digerido num tubo de 200 µl;
- A mistura PCR foi preparada, num tubo *ependorf*, conforme indicado no Quadro 9 e distribuído o volume obtido (20 µl) em tubo de 0,2 ml *puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), de seguida foi adicionado 5 µl de DNA diluído, tendo-se obtido um volume final de 25µl.

Quadro 9 - Constituição da Mistura PCR

Reagentes (concentração)	Volume	Concentração final
Água ultra pura	16,5 µl	-
MgCl ₂ (25mM)	1 µl	2,0
<i>EcoR1 G primer</i> (10µM)	2,5 µl	1µM
Total	20µl	

Cada tubo *puReTaq Ready-To-Go™ PCR Beads* contém na sua constituição, sob a forma desidratada: ≈2,5 U de **pure Taq DNA Polimerase**, dNTP's (dATP, dCTP, dGTP,dTTP), Tampão Reacção, BSA e Estabilizadores. Quando uma pérola (*bead*) é reconstituída com o volume total de 25 µl, a concentração final de cada dNTP é de 200 µM em 10mM Tris-HCl (pH 9.0 à temperatura ambiente), 50mM KCl e 1,5 mM MgCl₂.

- A mistura obtida foi submetida a um processo de desnaturação inicial a 94 °C durante 4 minutos, seguida de 35 ciclos sucessivos com a seguinte sequência: 1 minuto a 94 °C

para a desnaturação, 1 minuto a 60 °C para a ligação do *primer* e 2,5 minutos a 72 °C para a amplificação. O passo final foi o arrefecimento a 4 °C (Quadro 10). Para este processo foi utilizado o Termociclador Biometra, *TGradiente*.

Quadro 10 - Resumo das etapas que ocorrem no termociclador na fase de amplificação

Etapas		Temperatura °C	Duração (min)
1	Desnaturação inicial	94	4
2	Desnaturação	94	1
3	Ligação de primer	60	1
4	Amplificação	72	2,5
5	Conservação	4	-----

Temperatura da tampa: 105 °C; Número de ciclos: 35.

4.3. Electroforese dos fragmentos amplificados em gel de agarose

Os fragmentos amplificados, de cada uma das amostras, foram separados por electroforese em gel de agarose (Sigma – St. Louis, USA) a 2%, tendo-se procedido à sua preparação, conforme descrito no Anexo III e Anexo IV. Posteriormente foi, vertido no tabuleiro da tina de electroforese (Bio-Rrad *Wide mini subcell GT*) (Figura 11).

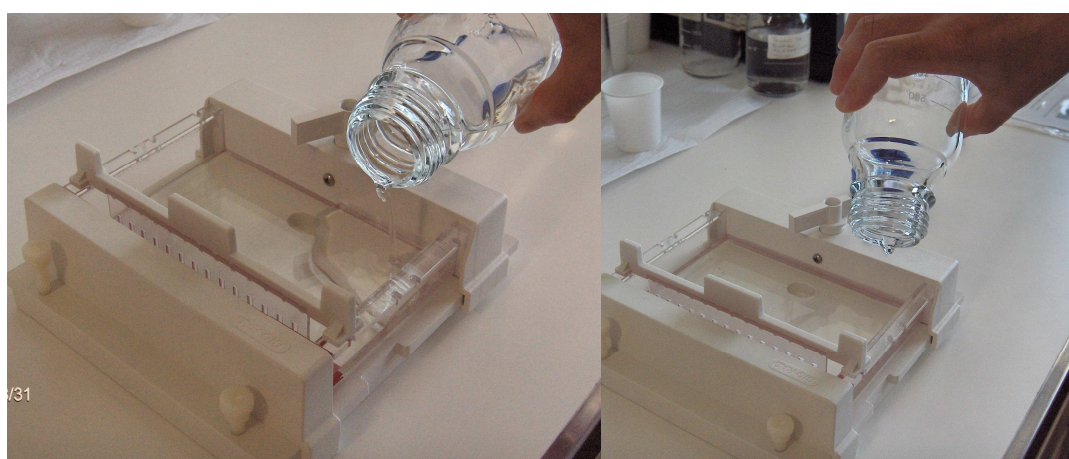


Figura 11 - Deposição do gel no tabuleiro da tina de electroforese

A cada uma das amostras foi adicionado 8,3 μ l de solução de deposição, *Gel loading solution* (Ladpuffer DNAI, Applichem), destinando-se este a conferir peso à amostra, mantendo-a dentro do poço do gel.

O carregamento das amostras no gel (Figura 12) foi realizado com a seguinte sequência: no primeiro poço, no poço do meio e no último poço colocou-se 10 μ l de marcador (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, ref^a 15628-019), cuja preparação se encontra descrita no anexo V, e nos restantes poços colocou-se 10 μ l de cada amostra, incluindo o controlo positivo e negativo.

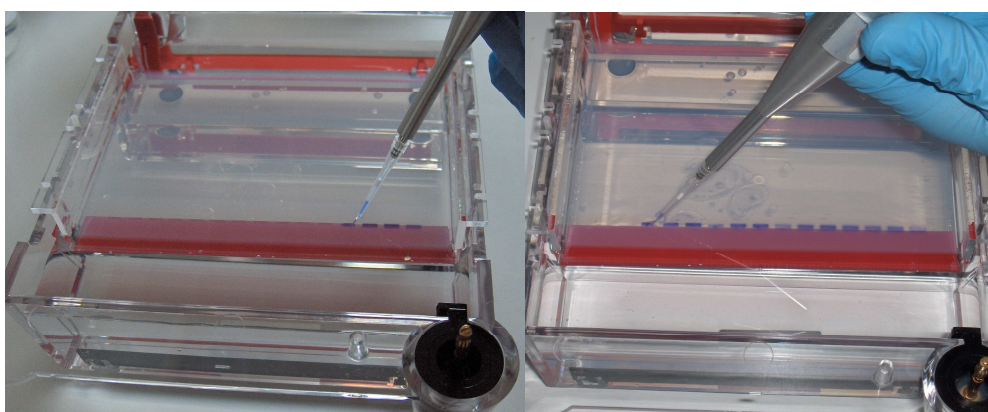


Figura 12 – Carregamento das amostras no gel

A separação electroforética foi realizada numa tina de electroforese (Bio-Rad *Wide mini subcell GT*), com tampão TAE 1x (UltraPure™ DNA Typing Grade® 50X TAE Buffer) durante 1.45h a 80 V.

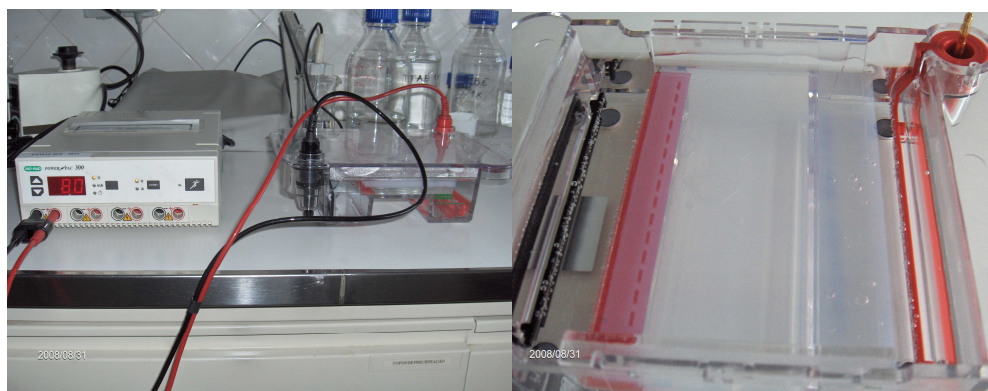


Figura 13 - Tina de electroforese ligada à fonte de alimentação – “Corrida de Electroforese”

No final da separação, o gel foi colocado num banho com brometo de etídio (0,5 µg/ml) (cuja preparação se encontra no anexo VI), durante 20 minutos, após o que foi observado por transiluminação *UV* e fotografado com câmara digital (*Kodack DC 290*) (Figura 14) devidamente adaptada, em formato *TIFF*.

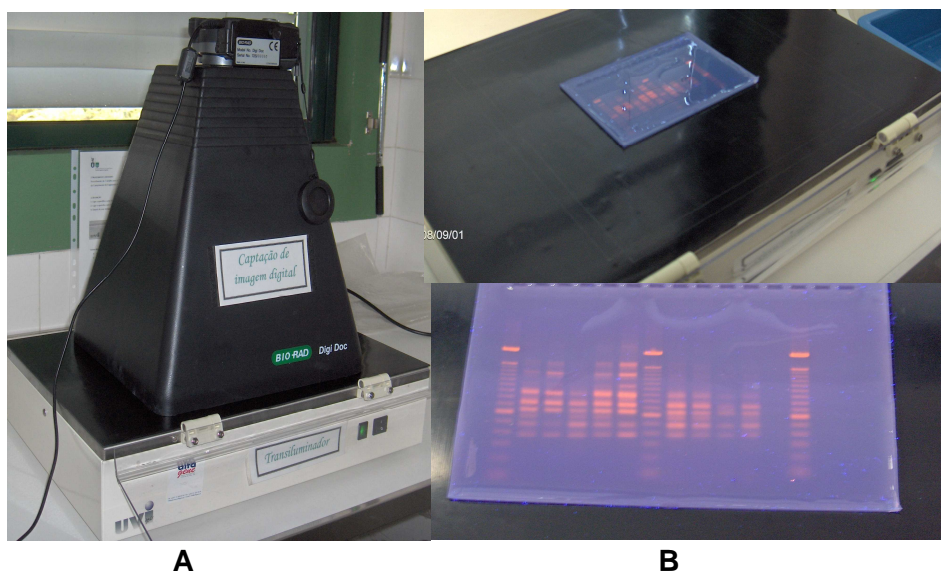


Figura 14 – A) Transiluminador (UViTEC) com sistema de captação de imagem (BioRad™) - B) Gel sujeito a radiação UV com perfis AFLP

Antes da análise informática dos perfis, procedeu-se à análise visual das imagens. Assim foram analisados os diferentes perfis de bandas, sendo atribuídos diferentes números romanos aos perfis com mais de duas bandas diferentes (Pintado, 2005; Matos, 2010, comunicação pessoal). Quando um determinado perfil for idêntico a outro anteriormente designado, mas com mais ou menos uma ou duas bandas diferentes relativamente a outro já existente, terá o mesmo número romano mas será associada uma letra (atribuída ao acaso, não devendo esta ser repetida para um perfil com características diferentes). Por exemplo, AFLP tipo IVd, significa que o padrão é semelhante ao tipo AFLP IV, mas tem duas bandas de diferença, sendo uma delas de tamanho distinto de qualquer uma do perfil IV. Assim dentro do grupo IV teremos um subgrupo IVd.

Identificados os perfis AFLP com o apoio da equipa da HPA, todos os geis foram analisados com o software Bionumerics© versão 5.10 (Applied Maths, Belgium) de modo a poder estudar a similaridade entre as estirpes. Numa primeira fase, através deste programa, os géis foram configurados. Para isso identificaram-se as colunas, em cada gel, retirou-se o ruído de fundo da imagem, definiram-se as bandas referência (600 bp, 1000 bp e 1500 bp) nos marcadores e normalizou-se o gel. Depois atribuíram-se as bandas, automaticamente, às amostras e, por último, estas foram rectificadas visualmente.

O intervalo das bandas considerado para análise situa-se entre 500bp e 1500bp. Além destes valores não se considera ser suficientemente reprodutível (Matos, 2010, comunicação pessoal). Esta metodologia de análise de AFLP é actualmente a usada no *Food Safety Laboratory* da HPA em Londres (Matos, 2010, comunicação pessoal).

A semelhança entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de *Dice*, com uma tolerancia de 2% e a partir da matriz de similaridade obteve-se o dendrograma pelo método *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means* (UPGMA).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Confirmação da pureza e verificação das características culturais

Neste trabalho foram usadas 51 culturas de *Listeria monocytogenes* ser. 4b, 4 das quais na fase de otimização do método de tipagem molecular AFLP e nos testes de reprodutibilidade e as restantes 47 para caracterização molecular.

Após confirmação da sua pureza, foram verificadas as características culturais de todas as 51 culturas, tendo-se observado, à lupa e com iluminação de Henry, colónias de morfologia típica (tonalidade bege azulado e superfície granulosa). No entanto, alguns isolados apresentaram colónias um pouco atípicas, com forma ligeiramente irregular e aspecto rugoso. Esta morfologia atípica das colónias foi verificada nos isolados com as referências ISA: 3001, 3072, 3074, 3086, 3094, 3098, 3100, 3177, 3176, 3219, 3220, 3225, 3246, 3286, 3444, 3445 e 3971. Segundo Seeliger & Jones (1986), estas características podem aparecer em culturas de *Listeria* spp. que são repicadas sucessivas vezes.

Todas as culturas foram igualmente repicadas para os meios de cultura agar-sangue e OAA, tendo-se confirmado as características da espécie *Listeria monocytogenes* nos dois meios: colónias β -hemolíticas em agar-sangue e colónias de tonalidade verde-azulada e com halo opaco em redor no meio OAA.

2. Optimização do método AFLP

Como já foi referido, previamente à caracterização dos 47 isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b, houve necessidade de alterar algumas das condições de ensaio com o objectivo de se optimizarem os resultados obtidos. Este método foi recentemente implementado no Laboratório de Biologia da ESACB no âmbito de um trabalho de estágio curricular (Leitão, 2008), mas apresentava alguns aspectos que careciam ser melhorados, nomeadamente ao nível da separação e definição das bandas, da captação da imagem do gel de agarose e da substituição do marcador.

Nesta primeira fase de optimização do método usaram-se 4 estirpes de *L. monocytogenes* com perfil AFLP conhecido, as quais tinham sido tipadas na *Health Protection Agency* (Pintado, 2005) e tinham também sido usados na implementação do método. De uma maneira geral, o protocolo agora seguido foi o mesmo que foi usado aquando da instalação do método, tendo por base o protocolo da HPA.

Os resultados obtidos no primeiro gel evidenciaram algum arrastamento entre bandas, deficiente separação e definição entre as mesmas, tendo as imagens sido gravadas em formato JPG. A partir daqui alteraram-se algumas condições de modo a conseguir melhores resultados.

A primeira alteração testada foi a concentração de agarose. Passou-se de 1,5% para 2,0% de agarose. Esta última é a percentagem que consta no folheto informativo para o marcador aqui usado (100 bp DNA Ladder da Invitrogen). De facto, com esta alteração, notou-se uma ligeira melhoria na separação e definição das bandas. Segundo Eça *et al.* (2004) citados por Rodrigues (2007), a porosidade da matriz é um dos factores que interfere na migração do DNA, para além do peso molecular, da conformação e

composição do ácido nucleico, da voltagem, da composição do tampão de corrida, da temperatura e da presença de corantes.

A par da alteração anteriormente referida, fez-se também o ajuste da voltagem usada na corrida de electroforese, tendo-se passado de 70V (voltagem inicialmente usada aquando da implementação do método) para 80V. Com este aumento não se notaram melhorias na separação/definição das bandas mas sim uma redução significativa no tempo de corrida de electroforese, com cerca 30min a menos quando comparada com a corrida realizada a 70V. Como referido por diversos autores, a corrente é um factor muito importante que deverá manter-se sempre constante desde o início até final da corrida electroforética, de modo a que a separação dos fragmentos amplificados se produza com eficácia.

A terceira alteração verificou-se ao nível do formato de gravação das imagens dos géis. Depois de se obterem as primeiras imagens em JPG e de se ter verificado não serem as ideais, por apresentarem uma fraca nitidez, testou-se a gravação em formato *Tiff*. A qualidade da imagem foi francamente melhorada, tendo-se começado, a partir daqui, a gravar as imagens com este formato.

3. Avaliação da reprodutibilidade do método AFLP

3.1 Reprodutibilidade interlaboratorial

No Quadro seguinte encontra-se a informação relativa às estirpes de *L. monocytogenes* usadas para a optimização do método e para avaliar a sua reprodutibilidade interlaboratorial.

Quadro 11 – Estirpes de *Listeria monocytogenes* usadas para testar a reprodutibilidade interlaboratorial do método AFLP

Referência /Ano	Origem /Região	Perfil AFLP
M37/95	Queijo curado - Castelo Branco	XV
M38/95	Queijo curado - Castelo Branco	XIV
M39/95	Queijo curado - Castelo Branco	IV-1
M52/95	Queijo curado - Castelo Branco	I

Estas 4 estirpes já tinham sido tipadas em dois laboratórios distintos: HPA em Londres (Pintado, 2005) e mais recentemente no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, INSA (Maia, 2009). Procedemos à comparação dos perfis então obtidos (Figura 15) com os obtidos neste trabalho (Figura 16). Através da análise visual, e considerando as bandas com pesos moleculares entre os 500 e os 1500 bp, constatámos que os perfis eram idênticos confirmando-se assim a reprodutibilidade entre laboratórios.

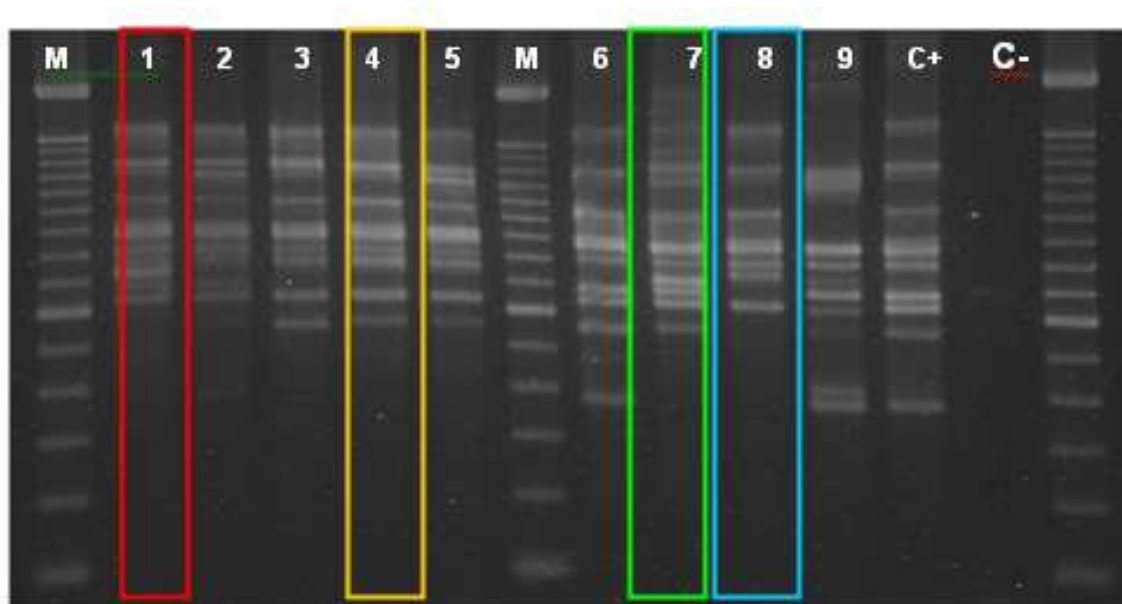


Figura 15 - Perfis AFLP de estirpes de *L. monocytogenes*, com perfil conhecido (perfis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e *L. innocua* (perfil 9) (usadas na implementação do método AFLP no INSA – Lisboa)

M- Marcador de 100 bp; **1-** M52 (AFLP tipo I); **2-** D15 (II); **3-** M44 (IV-1); **4-** M39 (IV-1); **5-** PM6 (IV-1+1); **6-** D6 (V); **7-** M38 (XIV); **8-** M37 (XV); **9-** D3 (XX); **C(+)-** ISA 3001 (V); **C(-)-** Controlo negativo.

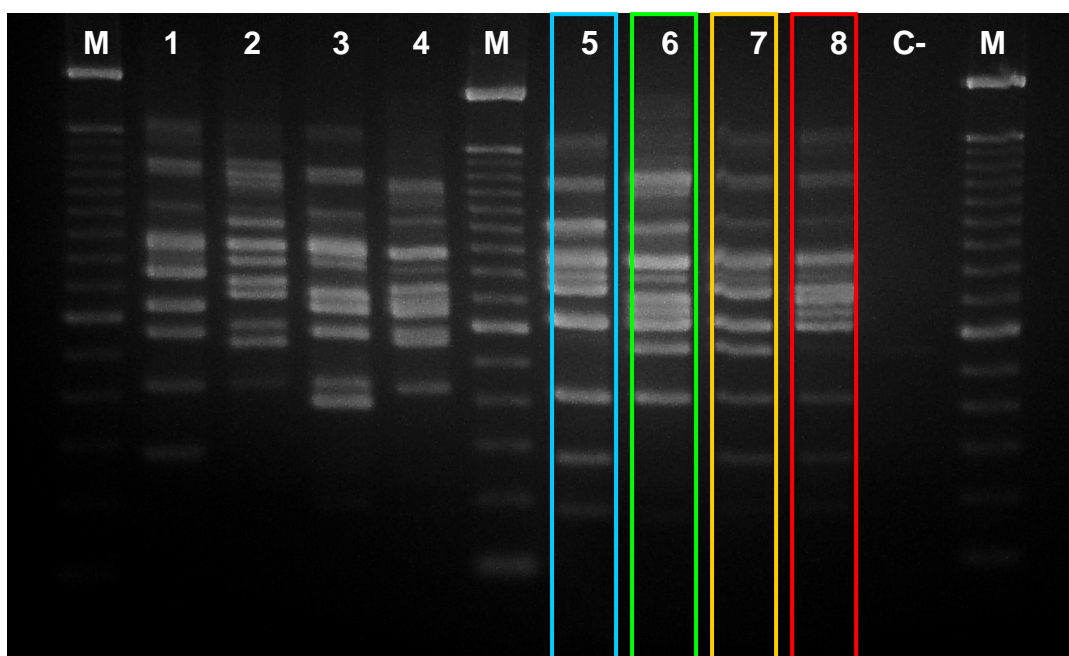


Figura 16- Perfis AFLP de estirpes de *L. monocytogenes* tipadas nos laboratórios da ESACB em Castelo Branco

M – Marcador de 100bp; **1** - QC/09; **2** - INSA/09; **3** - QM/08; **4** - QF/08; **5** - M37/95 (XV); **6** - M38/95 (XIV); **7** - M39/95 (IV-1); **8** - M52/95 (I); **C(-)** – Controlo negativo.

Este resultado está de acordo com os resultados obtidos em vários estudos acerca da reprodutibilidade deste método, com o uso de uma ou mais enzimas de restrição, na tipagem de *Listeria monocytogenes* ou de outras estirpes bacterianas (Janssen *et al.*, 1996; Kassama *et al.*, 2002; Guerra, 2003; McLauchlin *et al.*, 2004 ; Keto-Timonen, 2008; Pintado, 2009).

Para Savelkoul *et al.* (1999) a reprodutibilidade do método AFLP pode permitir a criação de uma base de dados de genótipos e a troca de dados entre laboratórios. Isto requer a utilização de reagentes e protocolos padronizados e depositários internacionais de estirpes. Para uma interpretação uniforme dos perfis AFLP, estes autores recomendam a formulação de directrizes como as desenvolvidas para PFGE.

3.2 Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade interna dos ensaios foi avaliada através da utilização de uma estirpe de referência (ISA 3001 - NCTC 11994) de perfil conhecido e que foi utilizada como controlo positivo ao longo dos ensaios. Esta reprodutibilidade foi avaliada através do programa *Bionumerics* e, tal como se pode ver no dendrograma (Figura 17) a semelhança entre os perfis obtidos em diferentes géis é de 100%.

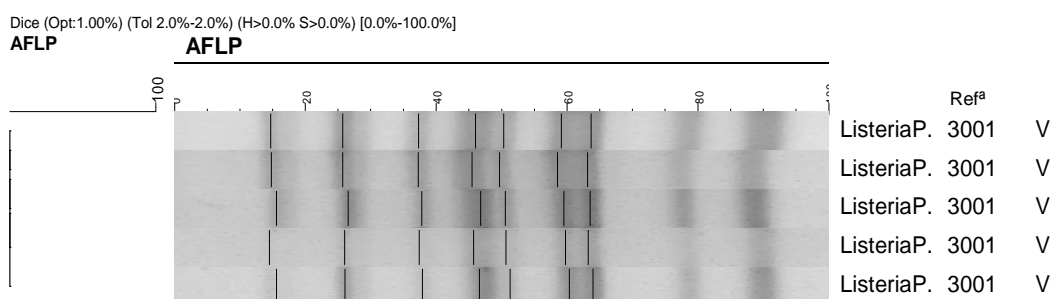


Figura 17 - Dendrograma resultante da análise por AFLP da estirpe de *Listeria monocytogenes* ISA 3001 (NCTC 11994), obtida em diferentes electroforeses. Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente Dice e com uma posição máxima de tolerância de 2,0%

4. Análise e identificação dos perfis AFLP de isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b

Os perfis obtidos após tipagem molecular por AFLP das estirpes de *L. monocytogenes* serotipo 4b podem ser observados nas imagens dos géis de agarose que se encontram nas figuras 18, 19, 20, 21 e 22.

Das 47 estirpes de *L. monocytogenes* analisadas, resultaram seis perfis diferentes com um número de bandas compreendido entre 5 a 7 no intervalo entre 500 bp e 1500 bp (delimitado a amarelo). Estes perfis, identificados como sendo tipo AFLP IVd, tipo AFLP Xe, tipo AFLP XIXb, tipo AFLP XIXg, tipo AFLP XIXm e tipo AFLP XIXr, foram assim classificados com o apoio do laboratório FPRU / HPA, usando os critérios de classificação e a base de dados aí existente para tipagem de *L.monocytogenes* por AFLP.

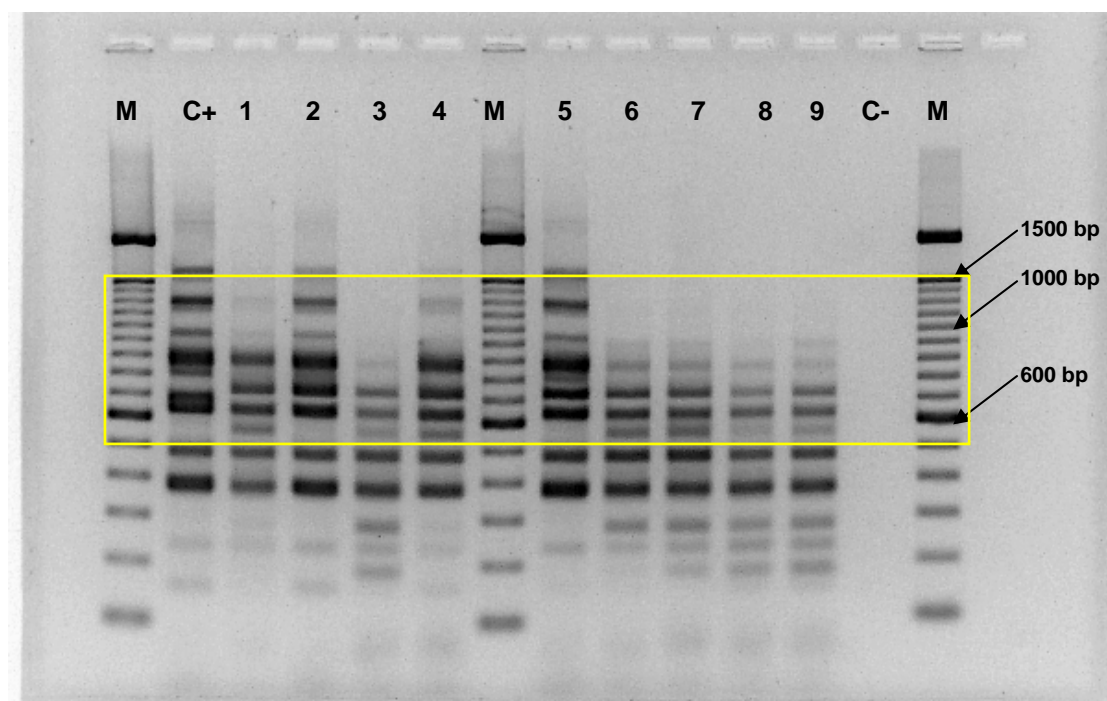


Figura 18 - Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha curado da região da Serra da Estrela (Gel 1)

M – Marcador; C(+) - Controlo positivo (AFLP tipo V); C(-) Controlo negativo; Perfis 1-9 correspondem às estirpes (tipo AFLP): 1 – ISA 3069 (XIXm); 2 – ISA 3072 (IVd); 3 – ISA 3074 (Xe); 4 – ISA 3076 (XIXm); 5 – ISA 3077(IVd); 6 – ISA 3086(Xe); 7 - ISA 3087(Xe); 8 – ISA 3088(Xe); 9 – ISA 3089(Xe).

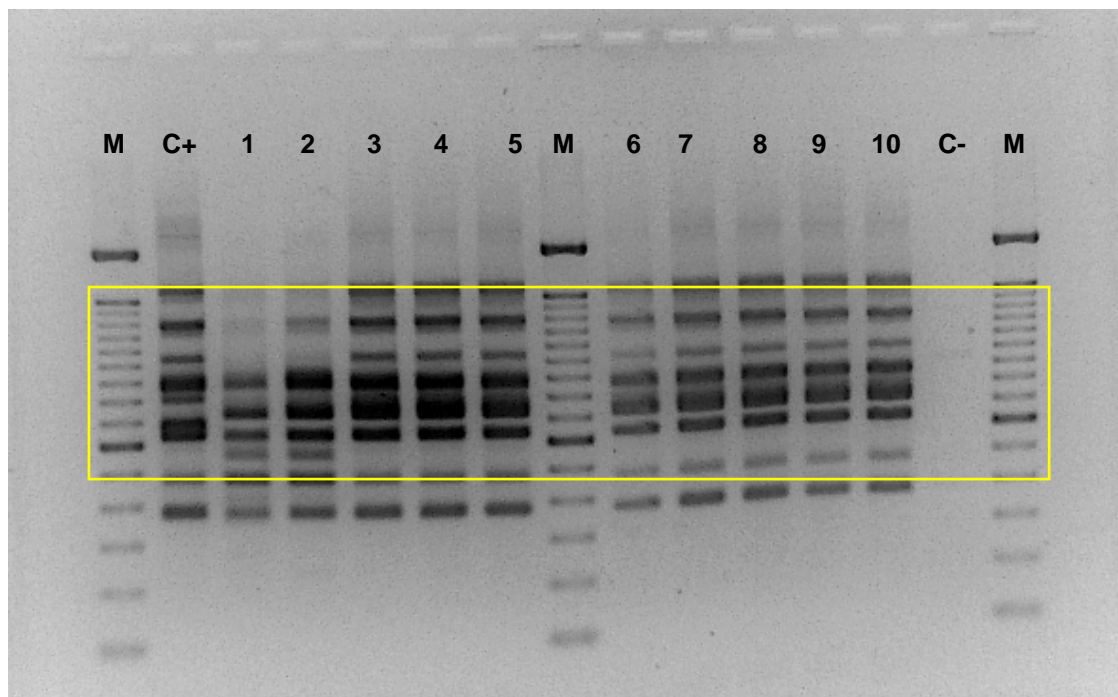


Figura 19 - Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha curado da região da Serra da Estrela (Gel 2)

M – Marcador; C(+) - Controlo positivo (AFLP tipo V); C(-) Controlo negativo; Perfis 1-10 correspondem às estirpes (tipo AFLP): 1— ISA 3090 (XIXm); 2— ISA 3091 (XIXm); 3— ISA 3092 (IVd); 4— ISA 3093(IVd); 5 – ISA 3094(IVd); 6– ISA 3095 (IVd); 7– ISA 3096 (IVd); 8– ISA 3097 (IVd); 9– ISA 3098 (IVd); 10- ISA 3099 (IVd).

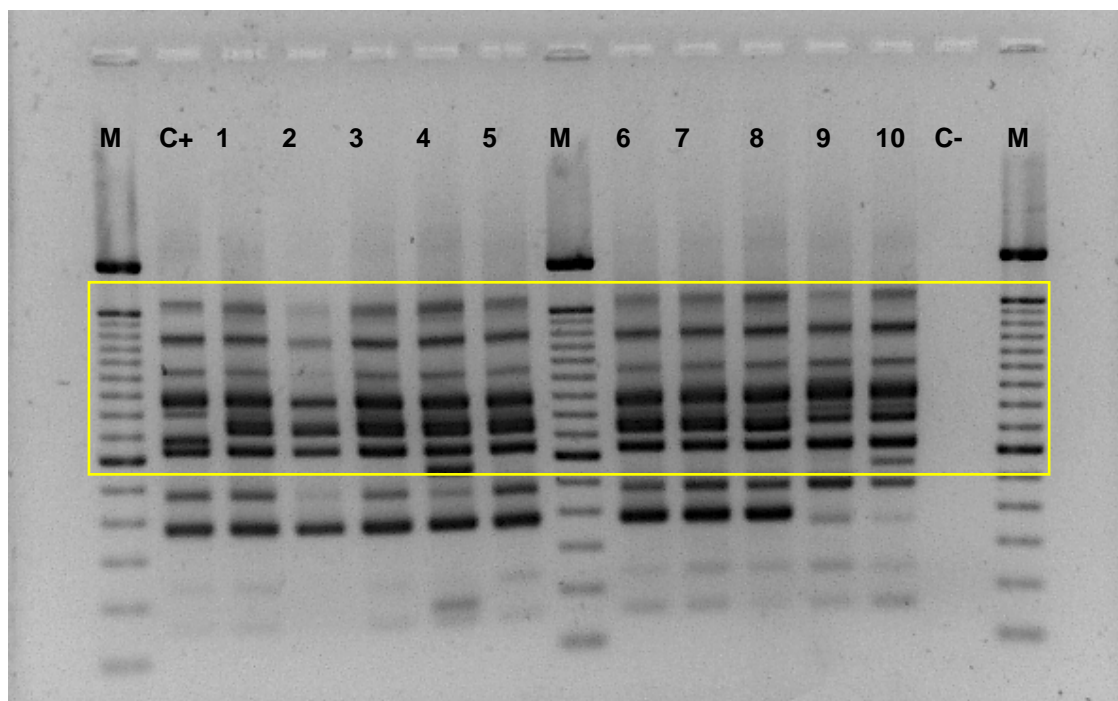


Figura 20- Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha curado da região da Serra da Estrela (Gel 3)

M – Marcador; C(+) - Controlo positivo (AFLP tipo V); C(-) Controlo negativo; Perfis 1-10 correspondem às estirpes (tipo AFLP): 1 – ISA 3100 (IVd); 2 – ISA 3101 (IVd); 3 – ISA 3102 (IVd); 4 – ISA 3103 (XIXb); 5 – ISA 3104 (IVd); 6 – ISA 3105 (IVd); 7 - ISA 3106(IVd); 8 - Repetição da ISA 3106 (IVd); 9 - ISA 3169 (IVd); 10 - ISA 3176 (XIXb).

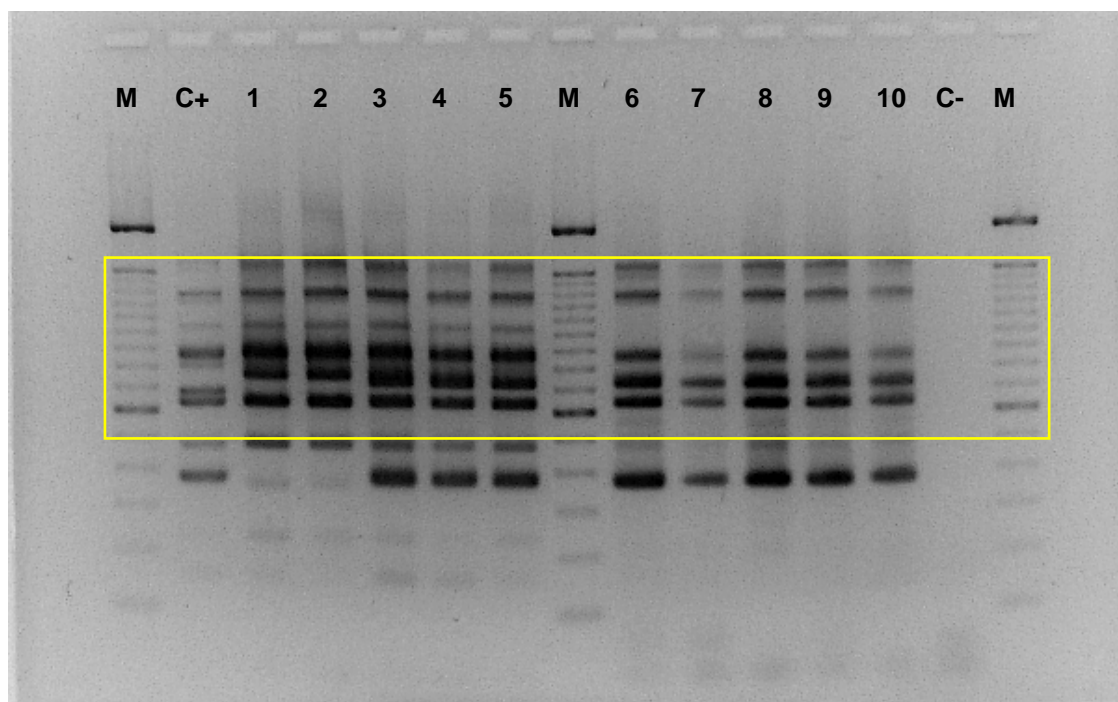


Figura 21 - Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha curado da região da Serra da Estrela (Gel 4)

M – Marcador; C(+) - Controlo positivo (AFLP tipo V); C(-) Controlo negativo; Perfis 1-10 correspondem às estirpes (tipo AFLP): 1- ISA 3177 (IVd); 2 - ISA 3178 (IVd); 3 - ISA 3219 (IVd); 4 – ISA 3220 (IVd); 5 – ISA 3225 (IVd); 6 – ISA 3245 (XIXg); 7 – ISA 3246 (XIXg); 8 - ISA 3251 (XIXg); 9 – ISA 3286 (XIXg); 10 - ISA 3326 (XIXg).

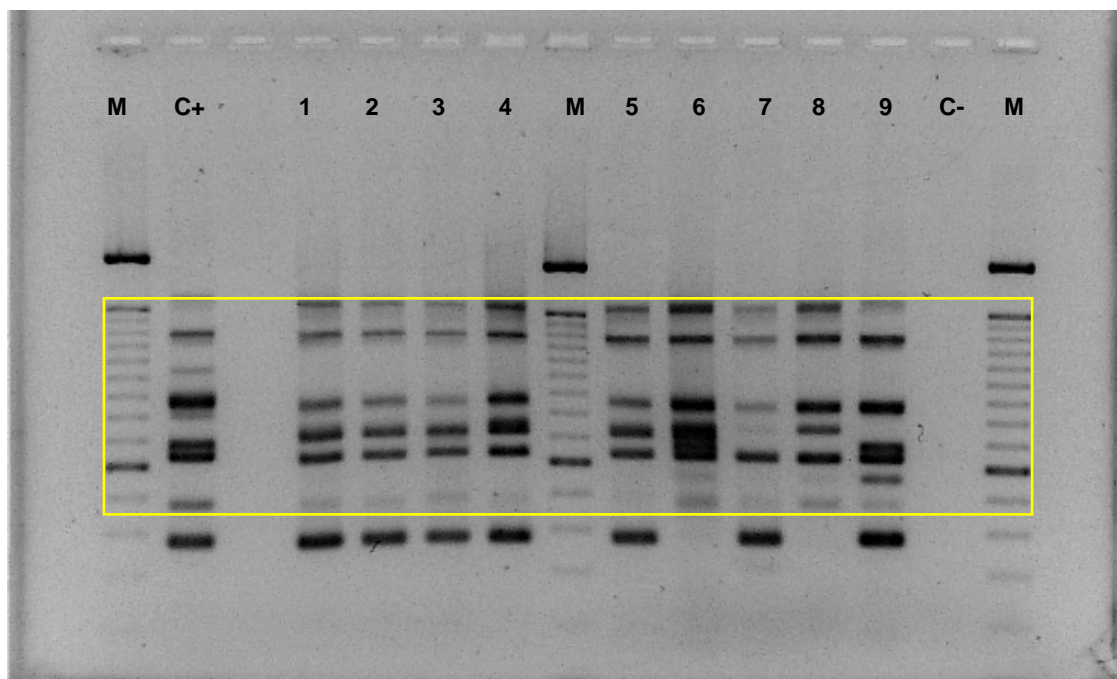


Figura 22 - Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha das regiões Serra da Estrela e Serpa e de queijo curado de vaca da região de São Jorge (Açores)(Gel 5)

M – Marcador; C(+) - Controlo positivo (AFLP tipo V); C(-) Controlo negativo; Perfis 1-9 correspondem às estirpes (tipo AFLP): 1– ISA 3444 (XIXg); 2 - ISA 3445 (XIXg); 3 - ISA 3446 (XIXg); 4 – ISA 3449 (XIXg); 5 – ISA 3450 (XIXg); 6 – ISA 3971 (XIXg); 7 - ISA 405 (XIXg); 8 - ISA 883 (XIXg); 9 – ISA 1375 (XIXr).

Tal como tem vindo a ser referido por alguns autores (Guerra, 2003; Pintado, 2005), em que *L. monocytogenes* foi tipada por AFLP, também verificamos a existência de uma banda comum a todos os perfis com aproximadamente 850 bp.

Verifica-se igualmente não ter havido contaminações ao longo dos ensaios, uma vez que os controlos negativos (água ultra pura estéril em vez de lisado celular) não apresentaram amplificação de produtos (Figuras 18, 19, 20, 21 e 22).

O Quadro 12 mostra que o AFLP tipo **IVd** é dominante, representando **46.8 %** (22/47) dos isolados de *L. monocytogenes*, seguido do tipo **XIXg** com 13 isolados, do tipo **Xe** com 5 isolados, do tipo **XIXm** com 4 isolados, do tipo **XIXb** com 2 isolados e do tipo **XIXr** com 1 isolado.

Quadro 12 – Perfis - AFLP de todos os isolados testados e percentagem de cada perfil dentro dos 47 isolados de *L. monocytogenes*

Perfil AFLP	Nº de isolados	%
IVd	22	46,8
Xe	5	10,6
XIXb	2	4,3
XIXg	13	27,7
XIXm	4	8,5
XIXr	1	2,1

5. Correlação entre o perfil AFLP e a origem geográfica dos isolados de *L. monocytogenes* serotipo 4b

Com o objectivo de estudar a possível associação entre o perfil AFLP e a origem geográfica dos isolados de *L. monocytogenes* serotipo 4b foi elaborado o Quadro 13. Da sua análise conclui-se haver somente um tipo molecular, o AFLP tipo XIXr, que apenas foi identificado na região de São Jorge. Pela observação do dendrograma da Figura 23, é possível ver que este isolado tem uma % de similaridade de apenas 67% relativamente à maioria dos restantes isolados, provenientes das regiões da Serra da Estrela, de Serpa e de São Jorge.

Quadro 13 – Distribuição dos perfis AFLP de *Listeria monocytogenes* de acordo com a sua origem e data de isolamento

Mês/Ano	Região de origem	<i>L. monocytogenes</i>						Total de isolados
		IVd	Xe	XIXb	XIXg	XIXm	XIXr	
Abril/2002	Serra da Estrela	2	1			2		5
Mai/2002	Serra da Estrela	4	4					8
Junho/2002	Serra da Estrela	10		1		2		13
Julho/2002	Serra da Estrela	3		1				4
Novembro/2002	Serra da Estrela	3			2			5
Dezembro/2002	Serra da Estrela				1			1
Janeiro/2003	Serra da Estrela				2			2
Fevereiro/2003	Serra da Estrela				5			5
Mai/2004	Serra da Estrela				1			1
NC(1)	Serpa				1			1
NC(2)	São Jorge (Açores)				1			1
NC(2)	São Jorge (Açores)						1	1

(1) - Não é conhecido o mês e o ano de isolamento; (2) – Não é conhecido o mês e o ano de isolamento, sabendo-se apenas que correspondem a isolados de queijarias diferentes e em épocas distintas.

Considerando a totalidade dos isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b, provenientes de queijos da região da Serra da Estrela, foi possível identificar 5 tipos AFLP. Quatro destes tipos (IVd, Xe, XIXb e XIXm) foram identificados em isolados obtidos apenas na região da

Serra da Estrela e apenas em 2002. O tipo AFLP XIXg, pelo contrário, já mostrou ter uma distribuição geográfica alargada (Serra da Estrela, Serpa e São Jorge) e, considerando a mesma região da Serra da Estrela, foi isolado durante um período que decorreu de Dezembro de 2002 a Maio de 2004.

Vários autores referem a existência de tipos moleculares específicos para uma determinada região, os quais poderão ser usados como marcadores geográficos. Tendo em conta os resultados acima referidos, esta classificação não poderá ser atribuída ao AFLP tipo XIXg.

Comparando agora os perfis de *L. monocytogenes* obtidos neste trabalho com os obtidos por Pintado (2005), usando o mesmo método em isolados provenientes de queijos elaborados com leite cru das regiões de Castelo Branco e de Tolosa, também pertencentes ao serotipo 4b, podemos constatar que não há tipos moleculares comuns. Nos isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b de queijos provenientes da região de Castelo Branco (n=58) foram identificados apenas 3 tipos AFLP (I, IV-1 e V). Nos isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b de queijos provenientes da região de Tolosa (n=3) foram identificados 2 tipos AFLP (II-1+1 e IV-1+1), diferentes dos anteriores. Estes dados indicam claramente uma associação entre um determinado tipo AFLP de *L. monocytogenes* ser. 4b e uma determinada região geográfica.

Com base no programa informático Bionumerics, os isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b foram agrupados em *clusters* que traduzem as relações de similaridade existentes entre eles (Figura 23). Pela análise do dendrograma obtido, observa-se a existência de 6 *clusters* para uma percentagem de similaridade de 98%. Estes 6 *clusters* foram agrupados de acordo com o tipo AFLP, previamente atribuído após análise visual dos perfis. Assim, obtivemos: (1) *cluster* com os 13 isolados AFLP tipo XIXg, com uma % de

similaridade de 98%; (2) *cluster* com os 22 isolados AFLP tipo IVd (99% de similaridade); (3) *cluster* com os 2 isolados AFLP tipo XIXb (100% de similaridade); (4) *cluster* com os 4 isolados AFLP tipo XIXm (100% de similaridade); (5) *cluster* com um único isolado, da região de São Jorge, pertencente ao AFLP tipo XIXr; (6) *cluster* com os 5 isolados AFLP tipo Xe (100% de similaridade).

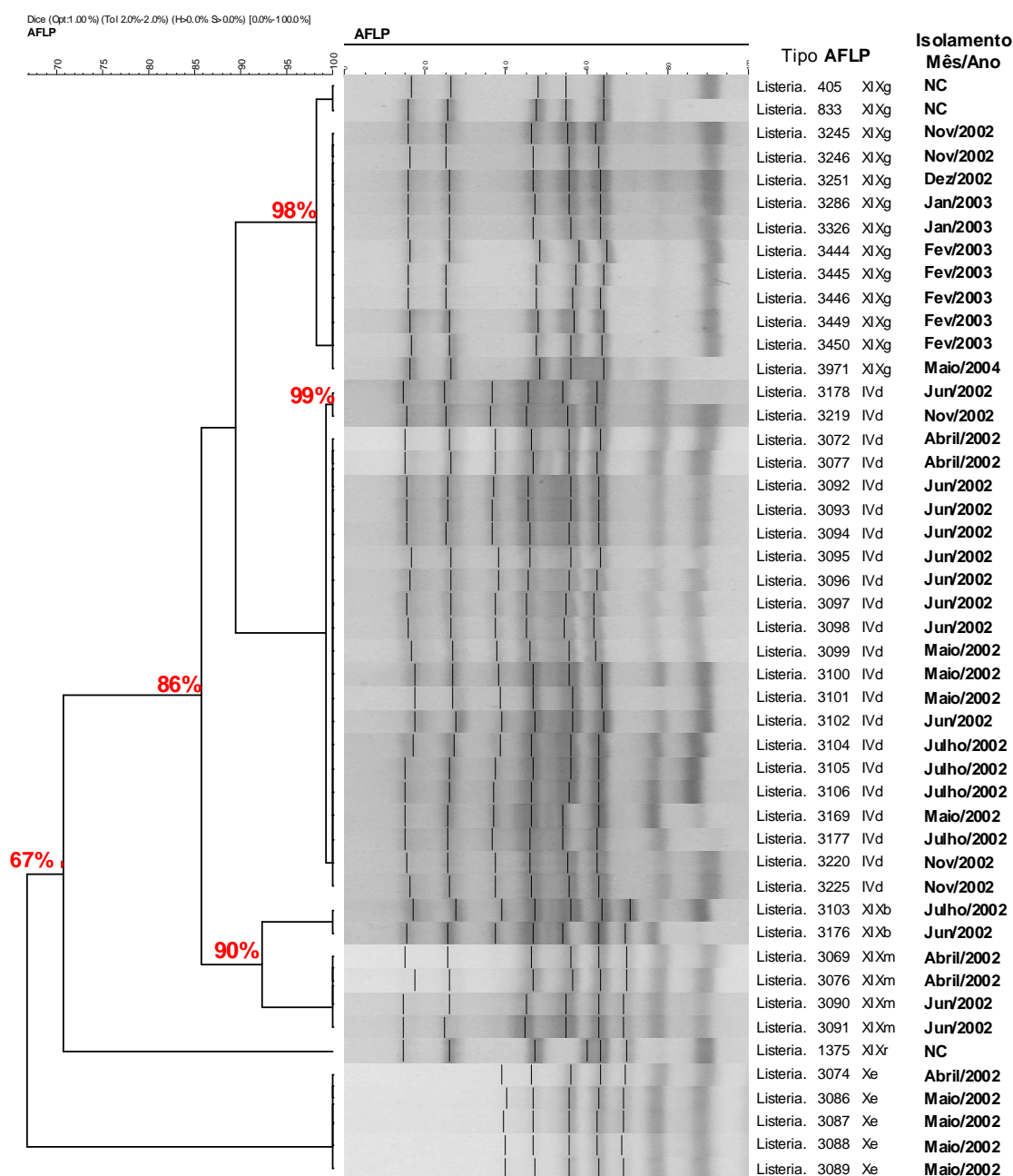


Figura 23 - Dendrograma mostrando a matriz de similaridade entre todas as estirpes de *L. monocytogenes* estudadas pela análise AFLP. Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente Dice, de padrões AFLP, com uma posição máxima tolerância de 2.0%

Legenda: (NC) – Não conhecido

O facto de termos obtido 6 tipos AFLP para estirpes pertencentes ao mesmo serotipo 4b confirma o que já se sabia, ou seja, que o método molecular AFLP tem um maior poder discriminatório do que a serotipagem.

Cerca de 42 isolados de *L. monocytogenes* ser. 4b provenientes da região da Serra da Estrela tinham sido anteriormente tipados por PFGE (Leite *et al.*, 2006), tendo-se obtido 5 tipos PFGE diferentes. Com base na aplicação do método AFLP, foram obtidos igualmente 5 tipos para o mesmo conjunto de estirpes, o que se traduz num igual poder discriminatório.

O poder discriminatório do método AFLP foi avaliado em 0,70 através da determinação do índice de diversidade de Simpson (Hunter & Gaston, 1988). Este índice estima a probabilidade de duas estirpes não relacionadas de uma população serem colocadas em diferentes grupos de tipagem.

De acordo com Savelkoul *et al.* (1999), estirpes com perfis que tenham 90 a 100% de similaridade entre si devem ser consideradas como idênticas, com 60 a 90% devem ser consideradas como estirpes diferentes mas da mesma espécie e com 40 a 60% consideradas espécies diferentes. Assim, as duas estirpes AFLP tipo XIXg provenientes das regiões de São Jorge e de Serpa podem ser consideradas idênticas às estirpes do mesmo tipo AFLP mas provenientes da região da Serra da Estrela, uma vez que apresentam 98% de similaridade. A % de similaridade encontrada dentro de cada um dos *clusters* associado a um tipo AFLP permite afirmar que as estirpes de cada *cluster* são idênticas entre si.

Dado sabermos à partida que todas as estirpes estudadas pertenciam à espécie *Listeria monocytogenes*, não era de prever a existência de *clusters* com homologias inferiores a

60%, o que se prova visto que a relação de similaridade mais afastada encontrada entre os 47 isolados foi de 67%, entre o tipo AFLP Xe e todos os restantes (Figura 23).

O perfil molecular AFLP Xe mostrou ser muito diferente dos restantes perfis de *L. monocytogenes* ser. 4b estudados. Apresenta apenas 5 bandas no intervalo considerado para análise (500 – 1500 bp), com pesos moleculares que variaram entre os 500 bp e os 1000 bp (Figura 18). Tendo em conta que os representantes da espécie *L. monocytogenes* se encontram divididos em 3 linhagens (Roberts *et al.*, 2006) e que existem estirpes do serotipo 4b na linhagem I e na linhagem III, podemos supor que as estirpes AFLP tipo Xe fazem parte de uma linhagem diferente das restantes estirpes serotipo 4b estudadas neste trabalho.

O estudo pretendia abranger um maior número de isolados por região e um maior número de regiões, o que não veio a ser possível, principalmente porque não existe o hábito de conservar as estirpes em colecção de culturas e os laboratórios contactados não isolaram *Listeria monocytogenes*, a partir de queijos, durante o período em que decorreu o trabalho experimental.

IV. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O principal objectivo deste estudo foi caracterizar molecularmente, com recurso ao método AFLP, 47 estirpes de *Listeria monocytogenes* ser. 4b isoladas de queijos curados produzidos em 3 regiões distintas Nacionais, entre 2002 e 2004 e provenientes de diferentes queijarias. Desta forma, pretendeu-se avaliar o grau de similaridade entre as estirpes, assim como a sua provável distribuição geográfica em função dos tipos moleculares obtidos. Este objectivo foi parcialmente atingido, na medida em que não foi possível reunir um conjunto de isolados de *Listeria monocytogenes* ser. 4b representativo de todas as principais zonas geográficas produtoras de queijos Portugueses, pelas razões já mencionadas no capítulo anterior. Esta primeira consideração final sugere a necessidade de um trabalho de colaboração entre os vários laboratórios que efectuam o isolamento deste microrganismo patogénico, coordenado a nível nacional ou internacional, para onde seriam encaminhados os isolados identificados como *L. monocytogenes* para posterior caracterização molecular. Desta forma, seria possível a criação de uma base de dados que poderia ser usada para estudos ecológicos e epidemiológicos, resultando num melhor conhecimento da realidade nacional. Isto requer a utilização de reagentes e protocolos padronizados para uma interpretação uniforme dos tipos AFLP obtidos, tal como já acontece com o método PFGE usado na rede de vigilância molecular *PulseNet*.

Neste trabalho, o método de tipagem AFLP apresentou um índice de diversidade de Simpson de 0,70 para o serotipo 4b, valor este igual ao obtido para o mesmo conjunto de estirpes após tipagem por PFGE. Vários autores têm referido um idêntico poder discriminatório para estes dois métodos. Neste trabalho foi também verificada a reprodutibilidade intralaboratorial e interlaboratorial com o método AFLP.

Com base nos resultados obtidos, verificou-se a existência de cinco em seis tipos moleculares AFLP cuja ocorrência se restringia a uma zona geográfica delimitada, o que permite considerar estes tipos moleculares como prováveis marcadores geográficos. De entre os vários factores que podem afectar a distribuição geográfica dos tipos moleculares está o facto dos queijos analisados serem elaborados com leite proveniente de regiões demarcadas, as quais não se sobrepõem geograficamente.

BIBLIOGRAFIA

- Aarts, H.J.M.; Hakemulder, L.E. & Van Hoef, A.M.A. (1999). Genomic typing of *Listeria monocytogenes* strains by automated laser fluorescence analysis of amplified fragment length polymorphism fingerprint patterns. *Int. J. Food Microbiol.* 49: 95-102.
- Allerberger, F. (2002). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* , 35: 183-189.
- Almeida, G.N.; Gibbs, P.A.; Hogg, T.A. & Teixeira, P.C. (2006). Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases*, 6: 1-4.
- Alves, A.; Henriques, I.; Santos, A.; Tacão, M. & Correia, A. (2003). *Mestrado em Microbiologia Molecular - Tipagem Genética de Microrganismos*. U. de Aveiro. (on line) 23 pp. Disponível em:
<<http://www.cesam.ua.pt/files/Manual%20Metodos%20de%20Tipagem.pdf>>
(acesso em 20 Outubro 2009).
- Aguado, V.; Vitas, A.I. & Garcia-Jalon, I. (2004). Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listera innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 90/3: 341-347.
- Arnold, C.; Metherell, L.; Willshaw, G.; Maggs, A. & Stanley, J. (1999). Predictive fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of *Escherichia coli*: high-resolution typing method with phylogenetic significance. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1274-1279.
- Batt, C. A. (1999). Rapid methods for detection of *Listeria*. In: E. T. Ryser e E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*. Marcel Dekker, Nova-Iorque, pp. 261-278.

-
- Bell, C. & Kyriakides, A. (1998). *Listeria*. Zaragoza, 173 pp.
- Beumer, R.R., & Hazeleger W.C. (2003). *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35,191-197.
- Bille, J. & Rocourt, J. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Murray, P.R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, R. H. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. D. C.: ASM. Washington, pp.461-471.
- Blears, M.J. ; De Grandis, S.A ; Lee, H. & Trevors, J.T. (1998). Amplified fragment length polymorphism (AFLP): review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21:99-114.
- Boerling, P. & Piffaretti. J.C. (1991). Typing of Human, Animal, Food, and Environmental Isolates of *Listeria monocytogenes* by Multilocus Enzyme Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 1624-1629.
- Bolivar, Z.R.; Piñales, R.A.P. & Camacho, A.K.C. (2008). Resistência antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. *Ciencias Biomédicas*, 6, 10: 101-236.
- Bonnet, M. & Montville, T.J. (2005). Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 237-242.
- Borges, M.F.; Andrade, A.P.C.; Edna Froeder Arcuri, E.F.; Kabuki, D.Y.; & Kuaye, A.Y. (2009). Documentos, 119. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. Embrapa, Agroindústria Tropical, Fortaleza, 31pp.
- Buchrieser, C; Rusniok, C.; Kunst. F.; Cossart, P. & Glaser. P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *Immunology & Medical Microbiology*, 35: 207-13.
- Boerema, J.A.; Clemens, R. & Brightwell, G.(2006). Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.*, 107:192-201.

- Brisse, S.; Fusing, V.; Ridwan, B.; Verhoef, J. & Willems, R.J.L.(2002). Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40: 1977-1984.
- Buncic, S.; Avery, S.M.; Rocourt, J. & Dimitrijevic, M. (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology*, 65, 3: 201-212.
- Byun, S.; Jung, S.C. & Yoo, H.S. (2001). Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology.*, 69: 227-235.
- Champion, O.L.; Best, E.L. & Frost, J.A. (2002). Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to campylobacters. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 2263-2265.
- Chambel, L.; Sol, M.; Fernandes, I.; Barbosa, M.; Zilhão, I.; Barata, B.; Jordan, S.; Perni, S.; Shama, G.; Adrião, A.; Faleiro, L.; Requena T.; Peláez, C.; Andrew, P.W. & Tenreiro, R. (2007). Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. *International Journal of Food Microbiology*, 116: 52-63.
- Chen, Y.; Zhang, W. & Knabel, S.J. (2005). Multi-virulence-locus sequence typing clarifies epidemiology of recent listeriosis outbreaks in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 5291-5294.
- Contreras, A. ; Sierra, D.; S´anchez, A.; Corrales, J.C.; Marco, J.C.; Paape, M.J. & Gonzalo, C. (2007), Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 68: 145-153.

- Cossart, P. & Archambaud, C. (2009). The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*: an emerging model in prokaryotic transcriptomics. *Journal of Biology* (on line) 8:107. Disponível em < <http://jbiol.com/content/8/12/107>> (acesso em: 5 Janeiro 2010).
- Cruz, C.D.; Martinez, M.B. & Destro, M.T.(2008). *Listeria monocytogenes*: an infectious agent scarcely known in Brazil. *Alimentos e Nutrição – Brazilian Journal of Food and Nutrition*, 19, 2: 195-206.
- De Boer, P.; Duim, B.; Rigter, A.; van der Plas, J.; Jacobs-Reitsma, W.F. & Wagenaar, J.A. (2000). Computer-assisted analysis and epidemiological value of genotyping methods for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J. Clin. Microbiol.* 38:1940-1946.
- Desai, M.; Logan, J.M.J.; Frost, J.A. & Stanley, J. (2001). Genome sequence-based fluorescent amplified fragment length polymorphism of *Campylobacter jejuni*, its relationship to serotyping, and its implications for epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3823-3829.
- Destro, M.T.; Leitão M.F.F. & Farber, J.M.,(1996). Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2 : 705-711.
- Dice, L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26:297-302.
- Donnelly, C.W. (2001). *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 59:183-194.
- Doumith, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P., Jacquet, C., Martins, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 8: 3819-3822.
- Doyle, M.P.; Meske, L.M. & Marth, E.H.(1985). Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufactory and storage of non fat dry milk. *Journal of Food Protection*, 48, 9: 740-742.

- Duarte, M.H. (1992). *Incidência de Listeria monocytogenes e Avaliação da qualidade higio-sanitária do queijo fresco Português*. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa.
- Duim, B.; Wassenaar, T.M.; Rigter, A., & Wagenaar, J. (1999). High-resolution genotyping of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2369-2375.
- EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, *The EFSA Journal* (2009), 223. (on line). Disponível em < <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/223r.pdf> > (acesso em: 15 Novembro 2009).
- EFSA (2010). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008, *The EFSA Journal* (2010), 1496. (on line). Disponível em <<http://www.efsa.europa.eu/fr/scdocs/doc/1496.pdf> > (acesso em :12 Março 2010).
- Eklund, M.W.; Poysky, F.T.; Paranjpye, R.N.; Lashbrook, L.C.; Peterson, M.E. & Pelroy, G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *Journal of Food Protection*, 58: 502-508.
- Esteves, A.; Saraiva, C.; Ribeiro, P.; Patarata, L. & Martins, C. (1996). *Listeria monocytogenes* and Hygienic Quality of Raw Meat. 42th International Congress of Meat Science and Technology. Lillehammer, Norway. Proc. 8-9.
- Farber, J.M.; Sanders, G.W. & Malcolm, S.A. (1988). The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Canadian Journal of Microbiology*, 34: 95-100.
- Farber, J. M. & Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55: 476– 511.

- Farber, J.M.; Ross, W.H.; & Harwig, J. (1996). Health riskassessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 30, 1/2: 145 -156.
- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. (2000). *Listeria monocytogenes*. *The Microbiological Safety and Quality of Food*, 2: 1178– 1232.
- Filipe, S. & Pintado, C.S. (2002). Ocorrência de *Listeria monocytogenes* numa Unidade Produtora de Queijo de Ovelha. Livro de Resumos da Conferência *Food Protection*, Monte da Caparica, Portugal. 22 de Fevereiro, 85.
- Food and Drug Administration (FDA)/Food Safety and Inspection Service (FSIS). (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from food borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponível em: < <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html> > (acesso em: 16 Novembro 2009).
- Fleming, D.W.; Cochi, S.L.; MacDonald, K. L.; Brondum, J.; Hayes, P.S.; Plikaytis, B.D.; Holmes, M.B.; Audurier, A.; Broome, C.V. & Reingold, A.L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *New England Journal of Medicine*, 312: 404-407,
- FPRU. (2003f). SOP-7916/01-03: *Amplified Fragment Length Polymorphism of Listeria monocytogenes using EcoRI*. Health Protection Agency.
- Franco, B. & Langraf, M. (1996). *Microbiologia dos alimentos*. Ateneu, São Paulo, 182 pp.
- Gandhi, M. & Chikindas, M.L. (2007), *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive (review). *International Journal of Food Microbiology*, 113, 1–15.
- Garrity, G.M.; Lilburn, T.G.; Cole, J.R.; Harrison, S.H.; Euzéby, J. & Tindall, B.J. (2007). Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007. Part 9 – The Bacteria: Phylum “*Firmicutes*”; Class “*Bacilli*”.(on line) 333-352. Disponível em <<http://www.taxonomicoutline.org/index.php/toba/index>> (acesso em: 15 Outubro 2009).

- Gasarov, U.; Hughes, D. & Hansbro, P.M. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev*, 29: 851-875.
- Gibson, J.R.; Ferrus, M.A.; Woodward, D.; Xerry, J. & Owen, R.J. (1999). Genetic diversity in *Helicobacter pullorum* from human and poultry sources identified by an amplified fragment length polymorphism technique and pulse-field gel electrophoresis.
- Geoffroy, C; Raveneau, J; Beretti, J.L. Lecroisey, A.; Vazquez-Bolland, J.A.; Alouf, J.E.; Berche, P. (1991). Purification and Characterization of an Extracellular 29-Kilodalton Phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *American Society for Microbiology*, 59, 7: 2382-2388.
- Germano, M.I.S. & Germano, P.M.L. (2001). *Listeriose*. Varela, São Paulo, 629 pp.
- Goebel, W. & Kreft, J. (1997). Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends Microbiology*, 5, 3: 86-88.
- Grady, R.; Desai, M.; O'Neill, G.; Cookson, B. & Stanley, J. (1999). Genotyping of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage type 15 isolates by fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 37:3198-3203.
- Gray M.L. & Killinger A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological Reviews*, 30: 309-382.
- Graves, L. M.; Swaminathan, B. & S. B. Hunter. (1999). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: E. T. Ryser e E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety*. Marcel Dekker, Nova -Iorque, pp. 279-297
- Guerra, M.M.M. (1995). Pesquisa de agentes patogénicos em leite e queijo de ovelha produzidos na região de Évora. Trabalho de Fim de Curso da Licenciatura em Engenharia Zootécnica . Universidade de Évora . Portugal.

- Guerra, M. & Bernardo, F. (1997). Occurrence of *Listeria spp.* in Traditional cheeses from Alentejo, Portugal. World Congress on Food Hygiene. The Hague. Proc. Book.
- Guerra, M.M. & Bernardo, F.M. A. (1999). Relevância sanitária de *Listeria monocytogenes* nos produtos lácticos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinária*, 94, 530: 142-148.
- Guerra, M.M. & Bernardo, F.M. A. (2000). Ocorrência de *Listeria spp.* em Leite e Laticínios Tradicionais Portugueses. *Revista Portuguesa de Zootecnia*, 2: 37-47.
- Guerra, M.M.; Bernardo, F.A. & McLauchlin, J. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 456-46.
- Guerra, M.M.M. (2003). Heterogeneidade feno e genotípica de *Listeria monocytogenes*. Dissertação de doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 217 pp.
- Guerra, M.M. & Bernardo, F.M. (2004). O risco da listeriose e a identificação do perigo – Revisão. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99, 550: 69-76.
- Hamdi, T.M.; Naim, M.; Martin, P. & Jacquet, C. (2007) Identification and Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* Isolated in Raw Milk in the Region of Algiers (Algéria). *International Journal of Food Microbiology*, 116, 1, 190-193.
- Hassan, L.; Mohammed, H. O & McDonough, P.L. (2001). Farm-managemen and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in NewYork state dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 51, 1/2: 63-73.
- Hof, H. (2003). History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35:199-202.
- Hofer, E. (1974). Contribuição ao estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de *Listeria monocytogenes* entre operários de matadouro e indivíduos com distúrbio entéricos. Tese de Livre Docência, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 114pp.

- Hofer, E. (2001). Três decênios de experiência sobre *Listeria* no Brasil. In: Mercadante A.Z., Bobbio P.A., Bobbio J.L., Pereira J.L. & Pastore G.M. (Ed.) *Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas*. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, Campinas, pp. 111-115.
- Hofer, E. & Reis, C.M.F.(2005). Species and serovars of *Listeria* isolated from sick and clinically healthy animals in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25, 2: 79-83:
- Holko, I.; Urbanová, J.; Kantikova, M.; Pastorova, K. & Kmet, V. (2002). PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Milk and Milk Products and Differentiation the Suspect Isolates. *Acta Veterinária Brno*, 71,125-31.
- Holt, J.G.,Sneath, H.A. & Sharpe, M.E.. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams e Wilkins, Baltimore. USA, 570 pp.
- Hong, Y.; García, M.; Levisohn, S.; Lysnyansky, I.; Leiting, V.; Savelkoul, P.H.M. & Kleven, S.H. (2005). Evaluation of amplified fragment length polymorphism for differentiation of avian mycoplasma species. *J. Clin. Microbiol.* 43: 909-912.
- Hunter, P. R. & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26, 2465–2466.
- Huss, H.H.; Jørgensen, L.V.; & Vogel, F.B.(2000). Control options for *Listeria monocytogenes* is seafood. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 267-274.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (1996). *Listeria monocytogenes*. Microorganisms in Foods 5 - Microbiological Specifications of Food Pathogens. Blackie Academic & Professional, London, 5: 141-182.
- International Life Sciences Institute Research Foundation / Risk Science Institute (ILSI). (2005). Expert Panel on *Listeria monocytogenes* in Foods. Achieving continuous improvement in reduction in foodborne listeriosis - a risk-based approach (Supplement). *Journal of Food Protection*, 68, 9: 1932-1994.

- Jacquet, C. ; Gouin, E. ; Jeannel, D. ; Cossart, P. & Rocourt, J. (2002). Expression of ActA, Ami, InlB, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 616-622.
- Jackson, P.J.; Hill, K.K.; Laker, M.T.; Ticknor, L.O. & Keim. P. (1999). Genetic comparison of *Bacillus anthracis* and its close relatives using amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction analysis. *J. Appl. Microbiol.*, 87: 263-269.
- Jaimes, C.P.;; Aristizábal, F.A.G.; Bernal, M.M.; Suárez, Z.R. & Montoya, D. (2006). AFLP fingerprinting of Colombian *Clostridium* spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. *Journal of Microbiological Methods*, 67: 64-69.
- Jay, J.M. (1996). Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Control*, 7, 4/5: 209-214.
- Janssen, P., Coopman, R.; Huys, G.; Swings, J.; Bleeker, M.; Vos, P.; Zabeau, M. & Kersters, K. (1996). Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142: 1881-1893.
- Johnsen, G., Kruse, H., & Hofshagen, M. (2006). Genetic diversity and description of transmission routes for *Campylobacter* on broiler farms by Amplified Fragment Length Polymorphism. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 1130-1139.
- Kathariou, S. (2002). *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J Food Prot.*, 65:1811–1829.
- Keto-Timonen, R.O.; Autio, T.& Korkeala, H.J. (2003). An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* Isolates. *Systematic Applied Microbiology*, 26: 236–244.

- Keto-Timonen, R. (2008). *Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis in strain typing and identification of Listeria and Clostridium species*. Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Finland, Helsinki.
- Lan, R., & Reeves, P.R. (2002). Pandemic spread of cholera: genetic diversity and relationships within the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 40:172-181.
- Larpent, J.P.(1995). *Les Listeria*. Ed.Tec e Doc.Paris, France,140 pp.
- Leite, P.; Rodrigues, R., Ferreira, M.A.S.S.; Ribeiro, G.; Jacquet,C.; Martin, P. & Brito, L. (2006). Comparative characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese farmhouse ewe's cheese and from humans. *Internatinal Journal of Food Microbiology*, 106: 11-121.
- Lecuit , M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, 9: 1216-1225.
- Leitão, A:M.M. (2008). *Implementação da Técnica AFLP (Amplified Fragment lenght polymorphisms) para a tipagem molecular de Listeria monocytogenes*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso do curso de Engenharia Biológica e Alimentar, Escola Superior Agrária de Castelo Branco, Castelo Branco.
- Liewen, M.B.;& Plantz, M.W. (1988). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *Journal of Food Protection*, 51: 840-841.
- Lindstedt, B.A.; Heir, E.; Vardund, T.; Melby, K.K. & Kapperud, G. (2000). Comparative fingerprinting analysis of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* by amplified-fragment length polymorphism genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 38: 3379-3387.
- Linnan, M.J.; Mascola, L.; Lou, X.D.; Goulet, V.; May, S.; Salminen, C. ; Hird, D.W.; Yonekura, M.I.; Hayes, P.; Weaver, R.; Audurier, A.; Plikaytis, B.D.; Fannin, S.L.; & Kleks, A.; Broome, C.V. (1988). Epidemic listeriosis associated with mexican-style cheese. *New England Journal Medicine*, 319, 13: 823-828.

- Lou, Y. & Yousef, A.E. (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 63/4: 1552-1555.
- Lovett, J.; Francis, D.W. & Hunt, J.M. (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *Journal of Food Protection*, 50, 3: 188-192.
- Lovett, J. & Twedt, R.M. (1988). Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. *Food Tecnology*, 42, 2: 188-191.
- Lovett, J. (1989). *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M. P. (Ed.). *Food-borne pathogens*, Marcel Dekker, New York, pp. 283-310.
- Lyautey, E.; Lapen, D.R.; Wilkes, G.; McCleary, K.; Pagotto, F.; Kevin Tyler, K.; Hartmann, A.; Piveteau, P.; Rieu, A.; William J. Robertson, W.J.; Medeiros, D.T.; Edge, T.A.; Gannon, V. & Topp, E.. (2007). Distribution and Characteristics of *Listeria monocytogenes* Isolates from Surface Waters of the South Nation River Watershed, Ontario, Canadá. *Applied And Environmental Microbiology*, 5401–5410.
- Maia, C.M.H. (2009). *Tipagem molecular de Listeria monocytogenes proveniente de queijo de ovelha e de origem humana por AFLP*. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Makey, B.M. & Bratchell, N. (1989). The Heat Resistance of *Listeria monocytogenes*: a Review. *Letters in Applied Microbiology*, 9: 89-94.
- Marth, E.H. (1988). Disease characteristic of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology*, 42, 51: 165-168.

- Martinez, I; Rorvik, L-M.; Brox, V.; Lassen,,J.; Seppola, M.; Gram, L. & Fønnesbech-Vogel, B. (2003). Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 84/3: 285:97.
- Martinis, E.C.P.; Crandall, A. D.; Mazzotta, A. S.; & Montville, T. J. (1997). Influence of pH, Salt, and Temperature on Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 60: 420-423.
- McLauchlin, J. (1996). The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. *Food Control*, 7, 4/5: 235-239.
- McLauchlin, J. (1997). The identification of *Listeria* species. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 77-81.
- McLauchlin, J.; Salmon, J.E.; Ahmed, S.; Braxier, J.S.; Brett, M.M.; George, R.C. & Hood, J. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium novyi*, *C. perfringens* and *Bacillus cereus* isolated from injecting drug users during 2000. *Journal of Medical Microbiology* . 51:990-1000.
- McLauchlin, J.; Mitchell, R.T.; Smerdon, W. J; Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92: 15-33.
- Mena, C.; Almeida, G.; Carneiro, L.; Teixeira, P.; Hogg, T. & Gibbs, P. A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology*, 21: 213-216.
- Miller, A.J. (1992). Combined Water Activity and Solute Effects on the Growth and Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal Food Protection*, 56: 944-948.
- Murray, E.G.D., Webb R.A. & Swann M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology & Bacteriology*, 29:407-439.

- Nakamura, H.; Hatanaka, M.; Ochi, K.; Nagao, M.; Ogasawara, J.; Hase, A.; Kitase, T; Haruki, K. & Nishikawa, Y. (2004). *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan., *International Journal of Food Microbiology*, 94, 3: 323-328.
- Nightingale, K.K.; Schukken, Y.H.; Nightingale, C.R.; Fortes, E.D.; A. J. Ho, A.J.; Her, Z.; Grohn, Y.T.; McDonough, P.L. & Wiedmann, M. (2004). Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 8: 4458-4467.
- Nogueira, C.A.M.; Momesso, C.A.S.; Machado, R.L.D.; Almeida, M.TG. & Rossit, A.R.B. (2004). Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. *Revista Panamericana de Infectología*, 6, 2: 35-38.
- Olive, D.M. & Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1661-1669.
- Nuez, F. & J. M. Carrillo. (2000). *Los marcadores genéticos en la mejora vegetal*. Editorial de la UPV.. Valencia.
- Pak, S.I.; Spahr, U.; Jemmi, T. & Salman, M.D. (2002). Risk Factors for *Listeria monocytogenes* Contamination of Dairy Products in Switzerland, 1990-1999. *Preventive Veterinary Medicine* 53: 55-65.
- Pedro, S.C.N.C. (1996). Ocorrência de *Listeria* em Pescado e a sua Ecorresistência em Meio Aquático. Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa,
- Pereira, D. & Pintado, C. S. (2000). Incidência de *Listeria monocytogenes* e outras *Listeria* spp. em leite cru de ovelha . Livro de Actas do Congresso Internacional *Food Safety*. Ipatimup, Niehs, Fcnaup, 10-11 Novembro 2000, Porto.
- Pereira, M.L. & Rocourt, J.. (1993). *Listeria monocytogenes* – Uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. *Revista Higiene Alimentar.*, 7, 26: 5-12.

- Pearson, K. (1926). On the coefficient of racial likeness. *Biometrika*, 18:105-117.
- Piffaretti, J.C; Kressebuch, H.; Aeschbacher, M.; Bille, J; Bannermann, E; Musser, J.M.; Selander, R.K. & Rocourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *PNAS*, 86: 3818-3822.
- Pintado, C.M.B.S. (1996). Isolamento de *Listeria monocytogenes* no queijo de Castelo Branco usando o meio IDF e o Listeria Tek-Elisa. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Pintado, C.M.B.S.; Oliveira, A.; Pampulha, M.E. & Ferreira, M.A.S.S.. (2005). Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, 22: 79-85.
- Pintado, C. M. B. S.; Ferreira, M.A.S.S; Grant, K.A.; Halford-Maw, R.; Hampton, M. D. & McLauchlin, J. (2007). Investigation of routes of contamination and persistence of *Listeria monocytogenes* in ewe's-milk cheese processing plants in Portugal. Presented at ISOPOL XVI - the 16th International Symposium on Problems of Listeriosis, Savannah, GA, 20 to 23 March 2007.
- Pintado, C.M.B.S. (2009). *Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de Listeria monocytogenes em queijo de ovelha*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agro-Industrial. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.
- Pintado, C.M.B.S.; Grant, K.A.; Halford-Maw, R; Hampton, M.D.; Ferreira, M.A.S.S.; McLauchlin, J. (2009). Association Between a Case Study of Asymptomatic Ovine Listerial Mastitis and the Contamination of Soft Cheese and Cheese Processing Environment with *Listeria monocytogenes* in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 5: 569-575.
- Pirie, J.H.H. (1927). A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease". *South African Inst. Med. Res. Publ.* 3:163-186.

- Phan-Thanh, L.; Mahouin, F., & Aligé, S. (2000). Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 121-126.
- Power, E.G.M. (1996). RAPD typing in microbiology; a technical review. *J. Hosp. Infect.*, 34: 247-265.
- Rasmussen, O.F.; Skouboe, P; Dons, I; Rossen, L. & Olsen, J.E. (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: Evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology*, 141: 2053-2061.
- Ribeiro, M.H.; Manha, S. & Brito, L.; (2006) ,The effects of salt and pH stress on the growth rates of persistent strains of *Listeria monocytogenes* collected from specific ecological niches. *Food Research International*, 39, 816–822.
- Ripabelli, G.; McLauchlin, J.; & and Threlfall, E.J. (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *System. Appl. Microbiol.* 23: 132-136.
- Roberts, A.; Nightingale, K.; Jeffers,G.; Fortes, E.; Kongo, J.M. & Wiedmann, M. (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology*, 152: 685–693
- Rocourt, J. & Bille, J. (1997). Foodborne listeriosis. *World Health Statistics Quarterly*, 50: 67-73.
- Rocourt, J. & Cossart, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R. e Montville, T.J. (Eds) ASM Press. *Food Microbiology*. USA, Washington D.C. pp. 337-352.
- Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser E.T. & Marth E.H. (Eds.) *Listeria, listeriosis, and food safety*. Marcel Dekker, Nova-Iorque, pp.1-130.
- Rocourt, J.; Jacquet, C. & Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 197-209.

- Rocourt, J.; BenEmbarek, P.; Toyofuku, H., & Shlundt, J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHOP approach. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35: 263-267.
- Rodrigues, M.V.P. (2007). Diagnóstico e Epidemiologia Molecular de Infecções Bacterianas (on line). Disponível em <http://www.ibb.unesp.br/eventos/erbm/documentos/mc9_prof.MarcusRodrigues.pdf> (acesso em: 22 Junho 2009).
- Rousseaux, S.; Olier, M.; Lemaitre, J.P.; Piveteau, P. & Guzzo, J. (2004). Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *inlA* for Rapid Screening of *Listeria monocytogenes* Strains Deficient in the Ability to Invade Caco-2 Cells. *American Society for Microbiology*. 70, 4: 2180-2185.
- Ryser, E.T. & Marth E.H. (1991). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, New York, USA, 632pp.
- Ryser, E. T. (1999). Incidence and behaviour of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. In: Ryser, E. & Marth, E.H. (Ed.). *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed. M. Dekker, New York, pp. 358-411.
- Ryser, E.T. & Marth, E.H. (2007). *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3ª ed. Taylor and Francis, Boca Raton, Florida, 873 pp.
- Sasahara, K.C. & Zottola, E.A.(1993). Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *Journal Food Protection*, 56, 12: 1022-1028.
- Sauders, B.D; Schukken, Y; Kornstein, L.; Reddy, V.; Bannerman, T.; Salehi, E.; Dumas, N.; Anderson, B.J.; Massey, J.P .& Wiedmann, M. (2006). Molecular epidemiology and cluster analysis of human listeriosis cases in three U.S. states. *Journal of Food Protection*,. 69:1680–1689.
- Savelkoul, P. H. M., Aarts, H. J. M., De Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L., & Lenstra, J. A..(1999). Amplified-Fragment Length Polymorphism Analysis: the State of an Art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 10: 3083–3091.

- Schlech, W.F.; Lavigne, P.M.; Bortolussi, R.A.; Allen, A.C.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; Hightower, A.W.; Johnson, S. E.; King, S.H.; Nicholls, E.S. & Broome, C.V. (1983). Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*. 308: 203–206.
- Schlech, W. F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31:770–775.
- Schmid, M; Walcher, M.; Bubert, A.; Wagner, M.; Wagner, M. & Schleifer, K. (2003). Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp. and genotypes of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35: 215-225.
- Schönberg, A.; Bannerman, E.; Courtieu, A.; Kiss, R.; McLauchlin, J.; Shah, S. & Wilhelms, D. (1996). Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, 32: 279-287.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. & Broome, C.V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clinical Microbiological Review*, 4: 169–183.
- Seeliger, H.P.H. & Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan, T. ; Norris, J.R. (Eds). *Methods Microbiology*. Academic Press. United Kingdom, London, pp. 31-49.
- Seeliger, H.P.R. & Jones, D. (1986). Genus *Listeria*. In: Sneath, P.H.A. (Ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. Baltimore. The Williams Wilkins, USA, pp.1235-1245.
- Silva, F. & Pintado, C. S. (2000). *Listeria monocytogenes* – Determinação dos Pontos Críticos de Controlo (PCC) numa Unidade Produtora de Queijo de Ovelha da Região da Beira Baixa. Food Safety. 10 e 11 de Novembro. Porto. Portugal. Livro de Resumos. 102.
- Silva, I.M.M.; Almeida, R.C.C.; Alves, M.A.O. & Almeida, P.F. (2003). Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 241-248.

- Sleator, R.D.; Wouters, J.; Gahan, C.G.M.; Abee, T. & Hill, C.. (2001). Analysis of the Role of OpuC, na Osmolyte Transport System, in Salt Tolerance and Virulence Potential of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 2692-2698.
- Sutherland, P. & Porrit, R.J. (1997). *Listeria monocytogenes*. In: Hocking, A.D.; Arnold, G.; Jenson, I.; Newton, K. & Sutherland, P. (Eds) *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance*. 5th Ed.. Australian Institute of Food Science and Technology Inc. (AIFST), NWS Branch, Food Microbiology Group. Australia. pp. 335-378.
- Tabouret, M.; Rycke, J. & Dubray, G. (1992). Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *Journal of General Microbiology*, 138, 4: 743-753.
- Tappero, J.W.; Schuchat, A.; Deaver, K.A.; Mascola, L. & Wenger, J.D. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The listeriosis study group. *JAMA Journal of the American Medical Association*, 273: 1118-1122.
- .Takeuchi, K. *et al.* (2006). Comparison of *Listeria monocytogenes* virulence in a mouse model. *Journal of Food Protection*, 69, 4, 842-846,.
- Ticknor, L.W.; Kolstø, A. B.; Hill, K.K.; Keim, P.; Laker, M.T., Tonks, M., & Jackson, P.J. (2001). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* soil isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4863-4873.
- Tompkin, R. B. (2002). Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Journal of Food Protection*, 65, 4: 709-725.
- Torpdahl, M.; Skov, M.N.; Sandvang, D., & Baggesen, D.L. (2005). Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods*, 63:173-184.

- Universidade Católica Portuguesa (UCP)/ Escola Superior de Biotecnologia (ESB) (2008). (on line) Disponível em < www.esb.ucp.pt/listeriose > (acesso em: 12 de Novembro).
- Valsangiacomo, C.; Baggi, F.; Gaia, V.; Balmelli, T.; Peduzzi, R. & Piffaretti, J.-C. (1995). Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1716-1719.
- Vázquez-Boland, J.A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; González-Zorn, B.; Wehland, & J.; Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 3: 584-640.
- Velappan, N.; Snodgrass, J.L.; Hakovirta, J.R.; Marrone, B.L. & Burde, S. (2001). Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 39: 77-83.
- Vialette, M.; Pinon, A.; Chasseignaux, E. & Lange, M. (2003). Growth kinetics of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. *International Journal of Food Microbiology*, 82:121-131.
- Viegas, S.J. (2009). *Alterações do estado de saúde associadas a alimentação : contaminação microbiológica dos alimentos* : Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Observação e Vigilância. Lisboa, 32 pp.
- Vogel, B.F.; Jorgensen, L.V.; Ojeniyi, B. ; Huss H.H. & Gram, L. (2001). Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 83-92.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. V. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kulper & M. Zabeau. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407 - 4414.

- Wagner, M. & Allerberger, F. (2003). Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35: 227-234.
- Walker, S.J.; Archer, P. & Banks, J.G. (1991). Growth of *Listeria monocytogenes* at Refrigeration Temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 157-162.
- Wang, L.L. & Johnson, E.A. (1997). Control of *Listeria monocytogenes* by Monoglycerides in Foods. *Journal Food Protection*, 60: 131-138.
- Wiedmann, M.; Bruce, J.L.; Keating, C.; Johnson, A.E.; McDonough, P.L. & Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and Immunity*, 65, 7: 2707-2716.
- Wiedmann, M. (2002). Molecular Subtyping Methods for *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International*, 85, 2:524-532.
- Zabeau, M., & Vos, P. (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. Publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13. European Patent Office, Munich, Germany.
- Zottola, E.A. & Smith, L.B. (1991). Pathogenes in Cheese. *Food Microbiology*. 8: 171-182.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - Extração de DNA bacteriano

ANEXO II - Preparação dos Adaptadores *Eco* AD1 , *Eco* AD2 e *Primer Eco* RIG

ANEXO III - Preparação da solução tampão TAE 1x

ANEXO IV - Preparação do Gel de Agarose

ANEXO V - Preparação do Marcador

ANEXO VI - Preparação do Brometo de etídio (et Br)

ANEXO I - Extracção de DNA bacteriano

Para a extracção de DNA usou-se o kit *Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation - DiversiLab™* (BioMérieux, Inc., USA)

Material

	Kit 50	Kit 250
Solução <i>MicroBead</i> DNA	16 ml	80 ml
Solução MD1	3 ml	15 ml
Solução MD2	6 ml	30 ml
Solução MD3	50 ml	250 ml
Solução MD4	16 ml	3 x 25 ml
Solução MD5	3 ml	15 ml
Tubos <i>MicroBead</i> DNA	50	250
<i>Spin Filters</i> em tubos de 2,0 ml	50	250
Colecção de tubos	200	1000

- Ansas de inoculação estéreis
 - Vortex
 - Microcentrífuga ($\geq 10.000\text{ g}$)
 - Meio de cultura
 - Luvas de laboratório
 - Micropipetas de 100 μl e 1000 μl
 - Pontas para micropipetas
 - Congelador
-

Método – Extracção de DNA

- 1- Inocular culturas em meio sólido.
 - 2- Verificar homogeneidade das colónias.
 - 3- Pipetar 300 μl de solução *MicroBead* DNA para um tubo *MicroBead*.
-

- 4- Recolher células da placa de cultura utilizando uma ansa de inoculação. Evitar a perfuração do agar. Adicionar células ao tubo *MicroBead*.
 - *Bactérias Gram negativas: utilizar ansa de 1 µl por duas vezes (2 µl)*
 - *Bactérias Gram positivas: utilizar ansa de 10 µl por uma vez (10 µl)*
- 5- Adicionar 50 µl da solução MD1 ao tubo *MicroBead* que contém as bactérias. Apertar a tampa do tubo *MicroBead*.
- 6- Agitar o tubo *MicroBead* em vortex, velocidade máxima, durante 10 min.
- 7- Pipetar 100 µl da solução MD2 para um microtubo novo de 2,0 ml.
- 8- Centrifugar o tubo *MicroBead*, durante 30 segundos, 10.000 g (≈ 12320 rpm).
- 9- Transferir o sobrenadante do tubo *MicroBead* para o microtubo de 2,0 ml que contém solução MD2. Agitação breve em vortex (Thermolyne Maxi Mix II) Incubar a 4°C (tempo mínimo 15 minutos).

Nota: A incubação a 4°C pode ser prolongada overnight.

- 10- Centrifugar microtubos durante 1 min a 10.000 g.
- 11- Pipetar 450 µl da solução MD3 para microtubo novo de 2,0 ml.
- 12- Transferir 200 µl do sobrenadante do microtubo de 2,0 ml do passo 10 para o novo microtubo que contém a solução MD3. Agitação breve em vortex e inversão de microtubos.

Nota: Durante a transferência do sobrenadante evitar tocar com a ponta da micropipeta no *pellet* de proteína.

- 13- Transferir 650 µl para microtubo *spin filter*. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 xg . Eliminar sobrenadante. Recolocar filtro no mesmo microtubo.
- 14- Pipetar 300 µl da solução MD4 no *spin filter* do passo 13. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 g. Eliminar sobrenadante. Recolocar o filtro no mesmo microtubo.
- 15- Centrifugar o microtubo com o *spin filter* durante 60 segundos a 10.000 g. Eliminar sobrenadante e microtubo.

Nota: O álcool é um inibidor de PCR. Não deverão permanecer resíduos de álcool no *spin filter*.

- 16- Colocar o *spin filter* num microtubo novo de 2,0 ml.
 - 17- Pipetar 35 µl da solução MD5 no centro do filtro. Centrifugar durante 30 segundos a 10.000 g.
-

Nota: Não tocar no filtro com a ponta da micropipeta.

18- Eliminar o *spin filter*. o DNA encontra-se no sobrenadante. Guardar a -20°C.

19- Quantificar DNA em espectrofotómetro e verificar qualidade do DNA em gel de agarose. Diluir amostras para 25-50 ng/μl com água destilada ou tampão TE.

Função das soluções utilizadas no Kit de extracção de DNA.

Solução	Função
<i>Microbead</i>	Constituído por sais e um tampão que estabiliza de forma homogénea as células microbianas antes da lise.
MD1	Constituído por Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e outros agentes de ruptura, necessários para a lise das células. SDS é um detergente aniónico utilizado para reduzir os ácidos gordos e lípidos das membranas celulares de vários organismos. A solução MD1 precipita quando fria mas, quando aquecida a 60° C dissolve o SDS e não prejudica a sua função de ruptura ou a de outros agentes.
MD2	Reagente usado para precipitar substâncias orgânicas e inorgânicas, como restos de células e proteínas, para permitir a remoção da contaminação que pode reduzir a pureza do DNA.
MD3	Contém uma elevada concentração de sal necessário para ligar o DNA à membrana do <i>spin filter</i> no passo seguinte.
MD4	Contém etanol para lavagem futura do DNA ligado à membrana de sílica no <i>Spin filter</i> . Esta solução de lavagem remove os resíduos de sal e outros contaminantes enquanto permite a ligação do DNA à membrana.
MD5	Contém uma solução tampão de eluição isenta de sal, capaz de garantir que toda a membrana se mantenha húmida para um melhor desprendimento do DNA ligado ao <i>spin filter</i> .

Adaptado de: kit *Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation* (BioMérieux, USA).

ANEXO II - Preparação dos Adaptadores *Eco AD1* , *Eco AD2* e *Primer Eco RIG*

Características:

Quer os adaptadores quer o primer são comercializados sob a forma liofilizada e cuja concentração original, depois da reconstituição com água ultra pura, é de 100 μM .

Adaptador/ Primer	Sequência (5' - 3')	Concentração original (Solução stock)	Concentração usada (Solução de trabalho)
Adaptador	<i>Eco AD1</i> ⁽¹⁾ 5'- CTC GTA GAC TGC GTA CC -3'	100 μM	10 μM
Adaptador	<i>Eco AD2</i> ⁽¹⁾ 5'- AAT TGG TAC GCA GTC TAC -3'	100 μM	10 μM
Primer	<i>Eco-R1G</i> ⁽¹⁾ 5'- GAC TGC GTA CCA ATT CG -3'	100 μM	10 μM

(1)- Marca: Metabion International GA - Martinsried, Deutschland

Devem sempre ser seguidas as instruções que acompanham os reagentes.

Assim, seguindo as mesmas instruções, para se obter 100 pmol/ μl , que é equivalente a 100 μM , do adaptador ***Eco AD1***, dissolve-se o conteúdo do tubo com 398 μl de água ultra pura e homogeneiza-se por pipetagem.

Para preparar a solução de trabalho, cuja concentração deverá ser de **10 μM** recorre-se à equação das diluições:

Por ex., se prepararmos **100 μl** da solução de trabalho temos:

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} \quad \text{onde : } (C_i = 100 \mu\text{M}) \quad (C_f): \text{Concentração inicial}$$

$$(C_f = 10 \mu\text{M}) \quad (C_f): \text{Concentração final}$$

$$(V_f = 100 \mu\text{l}) \quad (V_i): \text{Volume inicial}$$

$$(V_f): \text{Volume final}$$

$$V_i = \frac{10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l}}{100 \mu\text{M}} = \frac{1000 \mu\text{l}}{100} = 10 \mu\text{l}$$

O volume a pipetar da solução stock é 10 μ l, que adicionado a 90 μ l de H₂O ultra pura, dá um volume total de 100 μ l, que será a solução de trabalho com a concentração de 10 μ M.

Para preparar o outro Adaptador e o *primer* aplica-se a mesma metodologia devendo consultar-se o folheto de instruções, pois o volume de H₂O para a sua reconstituição é diferente.

Nota: todos estes trabalhos devem ser realizados em câmara de fluxo laminar.

ANEXO III - Preparação da solução tampão TAE 1x

A solução tampão TAE 1x para a electroforese foi preparada a partir da solução concentrada TAE 50x (UltraPure™ DNA Typing Grade® 50XTAE Buffer - refª: EC-872 – Hesse Hull, England)

Exemplo da preparação de 1litro de TAE 1x a partir de TAE 50X, e recorrendo à equação das diluições $C_i \times V_i = C_f \times V_f$:

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} \quad \text{onde : } (C_i = 50)$$

(C_i) : Concentração inicial

$$(C_f = 1)$$

(C_f) : Concentração final

$$(V_f = 1000ml)$$

(V_i) : Volume inicial

(V_f) : Volume final

$$V_i = \frac{1 \times 1000ml}{50} = 20ml$$

Assim, para preparar 1litro de solução TAE **1x**, mede-se **20 ml** da solução concentrada TAE 50x e perfaz-se, num balão volumétrico, até aos 1000 ml com água destilada.

ANEXO IV - Preparação do Gel de Agarose

Foi usada a agarose tipo II da marca Sigma (St. Louis, USA), ref^a A6877.

O gel é preparado em função da espessura, da percentagem de agarose que se pretende usar e do tipo de tina.

Se for usada a **tina Bio-Rad (*Wide Mini-Sub Cell GT*)** podem tomar-se como referência os volumes de tampão necessários para se obter uma determinada espessura, como pode ser visto no quadro seguinte:

Espessura do gel (mm)	Volume de tampão (ml)	Volume da tina (ml)	Dimensões do gel (mm)
2,5	30	650-900	150 x 100
5,0	60		
7,5	90		
10	120		

Por exemplo, para obter um gel a 1,5% e com espessura de 5 mm: pesar 0,9 g de agarose e adicionar 60 ml de tampão TAE1x

Modo de preparação:

Adicionada a agarose ao tampão, num frasco apropriado, leva-se ao microondas até dissolver completamente, ou seja até ficar transparente, tendo o cuidado de não deixar ferver, para evitar a saída do recipiente.

Deixar arrefecer à temperatura ambiente, nunca devendo arrefecer-se bruscamente à torneira. Depois de arrefecido, à volta dos 50 °C, verte-se no tabuleiro de preparação do gel (onde previamente foi colocado um pente, para formar os poços, que serão cheios com as amostras de DNA) e deixa-se solidificar.

Após solidificação da agarose retira-se o pente e o tabuleiro é colocado na tina de electroforese. Cobre-se de seguida com a solução tampão TAE 1x, para que a agarose não desidrate. A placa de gel de agarose, tal como os poços devem ficar completamente submersos.

Notas:

1- Depois de alguns ensaios em gel de agarose a 1,5% experimentou-se o gel de agarose a **2%** usando o mesmo volume de tampão (60 ml). O resultado revelou melhorias na definição das bandas, mas o enchimento tornou-se mais difícil, pois parte do volume da amostra de DNA depositado nos poços saía para fora destes. Esta dificuldade foi ultrapassada quando se aumentou o volume de tampão para **70ml**, permitindo assim obter poços com maior profundidade.

Após este acerto todos os géis foram preparados a 2% (1,4g de agarose) em 70 ml de tampão TAE 1x.

2- Deverá ter-se em conta o tipo de agarose que se escolhe, pois a qualidade do trabalho e a velocidade da corrida de electroforese podem ser influenciados pelas características da agarose.

Dos ensaios realizados obtiveram-se melhores resultados com a agarose da Sigma (St. Louis, USA) quando comparada com a da marca Bioron (Ludwigshafen am Rhein - Germany).

3- Na separação electroforética começou por usar-se uma voltagem de 70v, tendo posteriormente passado a usar-se 80v, uma vez que se reduziu o tempo da corrida de electroforese, não tendo com isto sido alterada a qualidade do trabalho.

ANEXO V- Preparação do Marcador

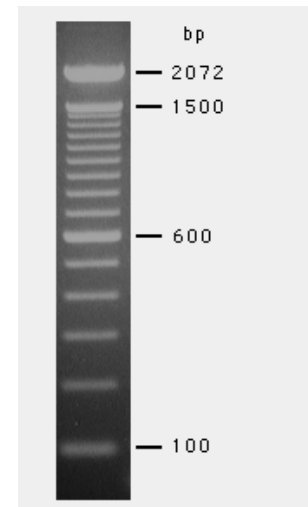
Características:

- 100 bp *DNA Ladder* da marca Invitrogen (Carlsbed-USA)
- Ref^a 15628-019 (quantidade/embalagem: 50 µg)
- Concentração: 1µg/µl (solução stock)

Consiste em 15 fragmentos entre 100 e 1500 bp em múltiplos de 100 bp e um fragmento adicional em 2072 bp.

A banda de 600 bp é aproximadamente 2 a 3 vezes mais brilhante do que as outras bandas do marcador para fornecer orientação interna.

Este marcador é adequado para medir tamanhos de fragmentos de DNA entre os 100 e 1500 bp, mas não está desenhado para quantificação.



100 bp DNA Ladder
0.5 µg/lane
2% agarose gel stained
with ethidium bromide

O marcador é usado com uma concentração de **50 ng/µl** (solução de trabalho)

Para a sua preparação recorreremos à equação das diluições: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

Por exemplo, se quisermos preparar uma **solução de trabalho** de **100 µl de marcador** com uma **concentração** de **50ng/µl** teremos :

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} \quad \text{onde : } (C_i = 1\mu\text{g} / \mu\text{l} \Leftrightarrow 1000\text{ng} / \mu\text{l}) \quad (C_i): \text{Concentração inicial}$$

$$(C_f = 50\text{ng} / \mu\text{l}) \quad (C_f): \text{Concentração final}$$

$$(V_f = 100\mu\text{l}) \quad (V_i): \text{Volume inicial}$$

$$(V_f): \text{Volume final}$$

$$V_i = \frac{50\text{ng} / \mu\text{l} \times 100\mu\text{l}}{1000\text{ng} / \mu\text{l}} = \frac{5000\mu\text{l}}{1000} = 5\mu\text{l}$$

Então, para se obter **100 µl de marcador**, com uma **concentração de 50 ng/ µl**, pipeta-se **5 µl** (com concentração inicial de 1µg/µl) e adiciona-se **95 µl de água destilada ultra pura**. Como o marcador vai ser depositado no gel de agarose tem que ter peso, para que não sai dos poços. Desta forma, parte do volume de 95 µl terá que ser substituído por **gel loading** (solução constituída à base de açúcar, para conferir peso, e um indicador, azul de bromofenol, que serve para visualizar a corrida de electroforese).

Relativamente ao modo de uso do **gel loading**, seguem-se as instruções do fabricante. Por exemplo, a marca Sigma recomenda entre 1 µl a 4 µl por cada 5 µl de amostra DNA.

No nosso caso foi usada uma proporção de 1/5. Assim:

$$\begin{array}{rcl} 1\mu\text{l (gel loading)} & \text{_____} & 5\mu\text{l (DNA)} \\ \times & \text{_____} & 100\mu\text{l (DNA marcador)} \end{array}$$

X= **20 µl** de *gel loading*

Assim temos:

5 µl de DNA do marcador	}	Adiciona-se a mistura por pipetagem, num microtubo de 1,5 ml
20 µl de <i>gel loading</i>		
75 µl de água destilada ultra pura		

100 µl de marcador com uma concentração de 50 ng/µl

ANEXO VI - Preparação do Brometo de etídio (et Br)

Características:

- Reagente tóxico por contacto (mutagénico)
- Ref^a: 17- 1328-01 - marca: Plusone (Uppsala, Sweden)
- Concentração: 10 mg/ml (solução stock)

A solução de **Brometo de etídio** é usada com uma concentração de **0,5 µg/ml** (solução de trabalho)

Modo de preparação:

Recorrendo à equação das diluições e para preparar por ex. um volume de 200 ml de solução de **et Br** temos:

$$V_i = \frac{C_f \times V_f}{C_i} \quad \text{onde : } (C_i = 10 \text{mg} / \text{ml} \Leftrightarrow 10000 \mu\text{g} / \text{ml})$$

$$(C_f = 0,5 \mu\text{g} / \text{ml})$$

$$(V_f = 200 \text{ml})$$

$$V_i = \frac{0,5 \mu\text{g} / \text{ml} \times 200 \text{ml}}{10000 \mu\text{g} / \text{ml}} = \frac{100 \text{ml}}{10000} = 0,01 \text{ml} = 10 \mu\text{l}$$

$$1000 \mu\text{l} \quad \text{_____} \quad 1 \text{ml}$$

$$x \quad \text{_____} \quad 0,01 \text{ml}$$

$$x = 10 \mu\text{l}$$

10 µl de et Br em 200ml de água destilada

Instruções de utilização:

- 1- Usar sempre luvas e bata;
- 2- Colocar a solução de **et Br**, preparada no passo anterior, numa tina e mergulhar o gel durante 15 min (se a solução já tiver sido usada algumas vezes, prolongar o tempo de permanência do gel);
- 3- Após o tempo de coloração o gel deverá ser tirado com muito cuidado para outra tina contendo água destilada, para diluir ligeiramente o **et Br** e de seguida colocado no transiluminador;
- 4- Antes de ligar o transiluminador devem ser colocados óculos de protecção UV, depois de ligado e seleccionado o melhor tempo de exposição, a imagem do gel é captada com câmara digital devidamente adaptada.