



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia**  
**Universidade Técnica de Lisboa**

## **Tipagem molecular de *Listeria monocytogenes* proveniente de queijo de ovelha e de origem humana por AFLP**

**Carla Maria Heliodoro Maia**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Alimentar**

Orientadora: Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira  
Co-orientadoras: Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado;  
Mestre Maria Isabel da Silva Santos

### **Júri:**

Presidente: Doutor Ricardo Manuel Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Teresa Ferreira de Oliveira Barreto Goulão Crespo, Investigadora Principal do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Universidade Nova de Lisboa;

Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, Professora Adjunta da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco.

Lisboa, 2009

*Esta dissertação é dedicada às pessoas mais especiais da minha vida:*

*Aos meus pais*

*Ao meu marido*

*Aos meus filhos, Tiago e Dinis*

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que tornaram este trabalho possível, nomeadamente:

À Professora Doutora Adélia Ferreira, por ter aceitado orientar a realização desta dissertação;

À Dr.<sup>a</sup> Isabel Santos, pelo interesse, incentivo, apoio e amizade demonstrados na co-orientação deste trabalho;

À Doutora Cristina Pintado, por me ter encaminhado e por ter aceitado co-orientar esta dissertação;

À equipa do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA, Loreto Campos, Isilda Ferreira, Nuno Rosa, Susana Santos, Madalena Ferreira, Helena Marques. Um especial obrigada à Eng.<sup>a</sup> Fernanda Oliveira pela ajuda e apoio prestados no desenvolvimento do método AFLP, à Dra. Rosália Furtado, pela amizade e sempre disponível ajuda e à Eng.<sup>a</sup> Cristina Belo Correia por todo o apoio moral e amizade;

À Dr.<sup>a</sup> Antónia Calhau e Dr.<sup>a</sup> Rosário Novais, por terem viabilizado a execução deste trabalho no DAN;

A todas as pessoas do INSA que de alguma maneira contribuíram para que este trabalho decorresse da melhor forma, especialmente Dr.<sup>a</sup> Raquel Rodrigues, por me ter orientado nos meus primeiros passos na área da tipagem molecular, Dr.<sup>a</sup> Rita Batista por ter disponibilizado o equipamento e o local para a implementação do método, Dr.<sup>a</sup> Margarida Saraiva pelos isolados de origem humana que me disponibilizou e Dr.<sup>a</sup> Eugénia Ferreira e Dr.<sup>a</sup> Vera Manageiro por terem possibilitado o uso do programa *Bionumerics*;

À Dr.<sup>a</sup> Ana Chung e ao Dr. Paulo Paixão do Hospital da Luz pela estirpe de origem clínica disponibilizada;

À Eng.<sup>a</sup> Ana Carla Silva, do Laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia, pelo apoio dado na aquisição dos reagentes;

À Eng.<sup>a</sup> Manuela Goulão, do Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco, pela ajuda prestada para a resolução de problemas relacionados com o método AFLP;

Aos meus pais, por todo o apoio e amor que sempre me deram e que dão agora aos meus filhos, sem eles nada disto teria sido possível;

Ao meu marido, por toda a dedicação, afecto, paciência e por ter “segurado as pontas”, muito obrigada;

Aos meus queridos filhos, que tantas vezes ficaram privados da minha presença, amovos muito.

E por fim, a todos aqueles, que apesar de não se encontrarem aqui especificados, me ajudaram a alcançar mais uma meta da minha vida. Muito obrigada.

## Resumo

A listeriose é uma infecção grave causada pelo consumo de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes*, pode afectar qualquer pessoa, especialmente os grupos de risco, os quais incluem grávidas, fetos, crianças, idosos e imunocomprometidos.

Para caracterizar e relacionar estirpes de *L.monocytogenes* encontradas nos alimentos e nos isolados clínicos foi implementado o método *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Com o objectivo de investigar possíveis relações entre estirpes, foram caracterizados, por AFLP, 27 isolados de *L.monocytogenes* provenientes de queijo de ovelha “Serra da Estrela” e 28 isolados clínicos provenientes de casos de listeriose humana, cedidos por hospitais de diferentes regiões do país.

A reprodutibilidade do método foi avaliada com a utilização de estirpes de *L.monocytogenes* com perfil AFLP conhecido.

Ao todo foram identificados 19 perfis AFLP diferentes, 4 provenientes de isolados de queijos e 15 de origem humana. A distribuição dos perfis AFLP, de isolados de queijos, pelas explorações é relativamente homogénea, sugerindo que existem estirpes mais comuns e recorrentes. Entre isolados humanos, observou-se a presença de estirpes idênticas entre si, mas distribuídas por várias regiões do país. Não foram encontrados perfis AFLP comuns entre as estirpes de *L.monocytogenes* implicadas em casos de listeriose e as estirpes de queijo “Serra da Estrela”.

**Palavras-Chave:** *Listeria monocytogenes*, AFLP, Listeriose, Queijo de ovelha, Isolados clínicos

## Abstract

Listeriosis is a severe infection caused by the ingestion of foods which are contaminated with *Listeria monocytogenes*, that can affect anyone, especially risk groups, which include pregnant women, fetuses, children, elderly and immunocompromised individuals.

To relate and characterize *L.monocytogenes* strains found in food and clinical isolates, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique was implemented. In order to investigate possible relationships between strains, 27 isolates of *L.monocytogenes* from *Serra da Estrela* sheep cheese and 28 isolates from clinical cases of human listeriosis, which are provided by hospitals in different portuguese regions, were characterized by AFLP.

The reproductibility of the technique was tested with *L.monocytogenes* strains with know AFLP profile.

There were identified a total of 19 different AFLP profiles, 4 isolates from cheese and 15 from clinical sources. The distribution of AFLP profiles from cheese isolates is relatively homogeneous by the farmhouses, suggesting that are more common and recurrent strains. We observed the existence of clinical strains among them, distributed throughout the country. There were no common AFLP profiles between *L.monocytogenes* strains implicated in listeriosis cases and *Serra da Estrela* cheese strains.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*; Listeriosis; AFLP; Raw sheep cheese; Clinical strains

## Extended Abstract

Listeriosis is a bacterial infection caused by the ingestion of foods contaminated with *Listeria monocytogenes*, that can affect anyone, but the group of greatest risk includes pregnant women, newborn infants, the elderly and immunocompromised individuals.

For the molecular characterization we choose the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) technique. This is a suitable method to determine if the strain isolated from a suspected food is the same that was found in the biological sample, giving us an accurate identification of the outbreak source and making it easy to control and prevent further occurrences. This method was chosen because of its reproducibility, discriminatory power and being a relatively quick method, allowing us to obtain results after 24 hours.

The AFLP analysis was performed on a set of 10 strains that have been previously typed in another laboratory. The interlaboratory reproducibility of the method was tested with the same strains and the final banding patterns were compared with those already known.

In the next step of this study, we performed the molecular typing on 27 strains belonging to 1/2a, 1/2b, 1/2c serovars, isolated from samples of *Serra da Estrela* sheep cheese, and 28 clinical isolates from human listeriosis cases, which are provided by hospitals in 3 portuguese regions (north, south, center region).

*Serra da Estrela* sheep cheese being a product distributed and consumed throughout the country. A low pH and high salt concentration are conditions that allow the *L. monocytogenes* development.

With the purpose of comparing the similarity between strains, the data obtained in this work were analyzed visually and using the BioNumerics™ software version 3.5 (Applied Maths, Belgium).

There were identified by AFLP technique, a total of 19 different AFLP profiles, 4 isolated from samples of *Serra da Estrela* sheep cheese and 15 isolates from clinical sources. The strains distribution of *L. monocytogenes* AFLP profiles from *Serra da Estrela* cheese is relatively homogeneous, suggesting that strains are more common and frequent. There is a greater diversity for human isolates and there were found identical strains in different regions of the country, there appears there are more frequent strains distributed throughout the country, this suggest a possible distribution of the similar contaminated food throughout the country.

There is no common AFLP profile between isolates of *L. monocytogenes* from clinical sources and isolates from *Serra da Estrela* cheese, suggesting that the cheese isolates studied are not involved in this listeriosis occurrences.

Some of the strains used in this study had been previously typed by molecular typing technique PFGE, by other authors. The results obtained by AFLP were compared with PFGE results obtained for the same strains.

We also compared *L. monocytogenes* strains of Castelo Branco sheep cheese, typed by AFLP, with strains of *Serra da Estrela* cheese. Apparently, 19 isolates from Castelo Branco cheese and 13 isolates from *Serra da Estrela* cheese, all with serovar 1/2b, are identical. It seems that the same strain is distributed by the regions of Castelo Branco and Serra da Estrela, which can be explained by the proximity of the regions.

## **Comunicações**

Maia, C.H.; Goulão, M.M.; Santos, M.I.; Ferreira, M.A.S.S.; Pintado, C.M.B.S. (2009), "Characterization of *Listeria monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b by Amplified Fragment Length Polymorphism and Evaluation of Their Geographical Distributions in Portugal". Resumo aceite para apresentação em poster no "ISOPOL XVII - International Symposium On Problems Of Listeriosis", a decorrer no Centro de congressos da Alfândega no Porto, de 5 a 8 de Maio de 2010.

(<http://conference.esb.ucp.pt/index.php/ISOPOL/XVII/presenter>)

# Characterization of *Listeria monocytogenes* 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b by Amplified Fragment Length Polymorphism and Evaluation of Their Geographical Distributions in Portugal

Carla H. Maia<sup>1</sup>, Maria M. Goulão<sup>2</sup>, Maria I. Santos<sup>1</sup>, Maria A.S.S.Ferreira<sup>3</sup>, Cristina M.B.S. Pintado<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., Lisboa

<sup>2</sup>Unidade Departamental de Biociências, Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco

<sup>3</sup>Departamento de Botânica e Engenharia Biológica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa

## Abstract:

Listeriosis is a bacterial infection caused by the ingestion of foods contaminated with *Listeria monocytogenes*, that can affect humans, especially the group that includes pregnant women, newborn infants, the elderly and immunocompromised individuals.

AFLP molecular subtyping, using *EcoRI* restriction enzyme, was used to do the differentiation between strains isolated from different Denomination of Protected Origin regions of cheese production in Portugal and as well from clinical specimens.

A set of 159 strains belonging to serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b isolated from samples of *Serra da Estrela* ewe's cheese, *São Jorge* cow's cheese, *Serpa* ewe's cheese, *Tolosa* ewe's cheese and *Castelo Branco* ewe's cheese were analyzed.

Evaluation of similarities between strains was obtained by analyses with BioNumerics™ software by Applied Maths, Belgium.

With AFLP molecular subtyping, nearly all the isolates were divided according to their serovar. Therefore it was possible to predict the serovar from the AFLP pattern found in most of the isolates. In the opposite direction, each one of the serovars was associated to several AFLP molecular types, which demonstrates the greater discriminatory capacity of the AFLP subtyping.

Similarities between profiles, based on band positions, were derived from the Dice correlation coefficient ( $S_D$ ) with a maximum position tolerance of 1%, 3% or 4%. *Listeria monocytogenes* strains were clustered by the technique of the UPGMA and a dendrogram was constructed to reflect the genetic distance between them.

**Key words:** Listeriosis; *Listeria monocytogenes*; amplified fragment length polymorphism (AFLP); molecular subtyping

## Índice

Agradecimentos .....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Extended Abstract.....	iv
Comunicações .....	vi
Índice .....	viii
Índice de tabelas .....	xi
Índice de figuras.....	xii
Lista de abreviaturas .....	xiii
I INTRODUÇÃO .....	1
1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.1 Caracterização de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.1.1 Taxonomia e caracterização bioquímica .....	1
1.1.2 Estrutura antigénica .....	2
2. Listeriose.....	3
2.1. Listeriose em humanos .....	3
2.1.1 Serovares envolvidos em listeriose .....	5
2.2. Dose infecciosa e mecanismos de infecção .....	5
2.2.1 Ciclo de infecção intracelular .....	6
3. <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	8
3.1. Principais fontes de contaminação .....	8
3.2. Contaminação na indústria de processamento de alimentos.....	8
3.3. Alimentos mais frequentemente associados a infecções.....	9
3.4. Presença de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijos.....	10
3.4.1 Queijo de ovelha “Serra da Estrela” .....	12
4. Tipagem de microrganismos .....	13
4.1. Importância da tipagem de microrganismos .....	13
4.2. Métodos de tipagem de microrganismos .....	14
4.2.1 Métodos fenotípicos .....	14
4.2.2 Métodos genotípicos.....	14

4.3. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> .....	18
4.3.1 Princípio do método AFLP .....	18
4.3.2 Modificações do método original.....	19
4.3.3 Análise de dados obtidos por tipagem molecular.....	21
5. Enquadramento geral e objectivos .....	21
II MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
1. Isolados bacterianos .....	24
2. Constituição da colecção de trabalho.....	28
3. Confirmação das características culturais e da pureza.....	28
4. Extracção de DNA.....	29
5. <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i> .....	31
5.1 Preparação dos adaptadores e do <i>primer</i> .....	31
5.2 Reacção de digestão de DNA com enzima de restrição e ligação aos adaptadores....	32
5.2.1 Preparação da mistura para a reacção de digestão/ligação .....	32
5.2.2 Digestão de DNA e ligação dos adaptadores.....	33
5.3 Reacção de amplificação em termociclador .....	34
5.3.1 Diluição da solução contendo os fragmentos de restrição .....	34
5.3.2 Preparação da mistura para a reacção de amplificação .....	35
5.3.3 Amplificação dos fragmentos de restrição em termociclador .....	35
6. Electroforese em gel de agarose.....	36
6.1 Preparação das soluções de trabalho .....	36
6.1.1 Solução azul de bromofenol.....	36
6.1.2 Solução de marcador.....	36
6.1.3 Solução para coloração do gel.....	37
6.1.4 Tampão Tris-Acetato-EDTA 1x.....	37
6.1.5 Gel de agarose 2%.....	37
6.2 Preparação das amostras e aplicação no gel.....	37
6.3 Electroforese .....	38
6.4 Coloração do gel .....	39
7. Revelação do gel de agarose .....	39
8. Análise com o software BioNumerics .....	39
III RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40

1. Implementação e otimização do método .....	40
2. Reprodutibilidade .....	42
2.1 Reprodutibilidade interlaboratorial .....	42
2.2 Reprodutibilidade interna.....	43
3. Estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> de queijo de ovelha “Serra da Estrela” .....	44
4. Estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana.....	50
5. Relação entre isolados de origem humana e de queijos “Serra da Estrela” .....	55
IV CONCLUSÃO .....	58
V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Surtos de listeriose associados ao consumo de queijo.....	11
Tabela 2 - Características de métodos de tipagem de microrganismos.....	16
Tabela 3 – Isolados de <i>Listeria</i> com perfil AFLP conhecido.....	25
Tabela 4- Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de queijo de ovelha “Serra da Estrela” .....	26
Tabela 5 -Isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana de 3 regiões do país .....	27
Tabela 6 -Características dos adaptadores <i>Eco</i> ADH1 e <i>Eco</i> ADH2 e <i>primer Eco</i> G.....	31
Tabela 7 - Mistura para a reacção de digestão de DNA e ligação aos adaptadores .....	33
Tabela 8 - Etapas da reacção de digestão de DNA / ligação aos adaptadores.....	34
Tabela 9 - Mistura para a reacção de amplificação em termociclador .....	35
Tabela 10 - Etapas para amplificação de fragmentos de restrição em termociclador .....	36
Tabela 11- Relação entre os <i>clusters</i> obtidos por AFLP, o serovar e a exploração de origem dos isolados de queijo “Serra da Estrela” .....	48
Tabela 12- Relação entre os <i>clusters</i> de <i>L. monocytogenes</i> , obtidos por AFLP, e a região de origem dos isolados clínicos.....	53

## Índice de figuras

Figura 1 - Percurso de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	6
Figura 2 - Processo de infecção por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	7
Figura 3- Etapas envolvidas no decorrer do método AFLP.....	19
Figura 4- Método AFLP utilizando a enzima de restrição <i>Eco RI</i> . .....	20
Figura 5- Colónias características de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio ALOA .....	29
Figura 6- <i>Kit</i> para extração de DNA <i>Mo Bio UltraClean™</i> .....	30
Figura 7- Câmara de segurança biológica.....	32
Figura 8 – Termociclador Gene Amp® - PCR System 9700 (Applied Biosystems) .....	34
Figura 9 – Posição das amostras e do marcador no gel de agarose. ....	38
Figura 10 – Tina de electroforese e respectiva fonte de alimentação .....	38
Figura 11- Sentido da migração dos fragmentos de DNA em direcção ao pólo positivo. ....	39
Figura 12- Perfil do marcador de 100bp <i>DNA Ladder</i> (Invitrogen) em gel de agarose.....	42
Figura 13 - Perfis AFLP das estirpes de <i>L. monocytogenes</i> (perfis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e <i>L. innocua</i> (perfil 9) usadas na implementação do método AFLP .....	43
Figura 14- Dendrograma resultante da análise por AFLP, da estirpe de <i>Listeria monocytogenes</i> 3001 (NCTC 11994), obtida em diferentes electroforeses .....	44
Figura 15 - Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo “Serra da Estrela” .....	45
Figura 16- Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo “Serra da Estrela”.....	45
Figura 17- Perfis AFLP dos isolados de <i>L. monocytogenes</i> de queijo “Serra da Estrela”.....	46
Figura 18 - Dendrograma resultante da análise por AFLP, dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de queijo “Serra da Estrela” .....	47
Figura 19- Perfis AFLP dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana.....	50
Figura 20- Perfis AFLP dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana.....	51
Figura 21- Perfis AFLP dos de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana.....	51
Figura 22 - Dendrograma resultante da análise por AFLP, dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> de origem humana.....	52

## Lista de abreviaturas

AFLP:	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
ALOA:	<i>Agar Listeria</i> segundo Ottaviani & Agosti
ATCC:	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI:	<i>Brain Heart Infusion</i>
bp:	Pares de bases
C:	Citosina
COH:	<i>Columbia Agar</i> com 5% sangue de cavalo
DAN:	Departamento de Alimentação e Nutrição
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP:	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
EDTA:	Ácido Etilenodiaminotetracético
EUA:	Estados Unidos da América
G:	Guanina
INSA:	Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISA:	Instituto Superior de Agronomia
g:	Unidade de Medida da Força Centrifuga
H <sub>2</sub> S:	Sulfureto de hidrogénio
HPA:	<i>Health Protection Agency</i>
NaCl:	Cloreto de Sódio
NCTC:	<i>National Collection of Type Cultures</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE:	<i>Pulsed Field Gel Electroforesis</i>
pH:	Potencial hidrogeniónico
RAPD:	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i>
TAE:	Tris Acetato-EDTA
TSA:	<i>Tryptone Soya Agar</i>
TSB:	<i>Trypticase Soya Broth</i>
UPGMA:	<i>Unweighted Pair Group with Arithmetic Means</i>
V:	Volt
µL:	Microlitro

# I INTRODUÇÃO

## 1. *Listeria monocytogenes*

O primeiro isolado de *Listeria monocytogenes* data de 1918, tendo sido isolado a partir de fluido cerebrospinal por Dumont e Cotoni, e posteriormente identificado como *Listeria monocytogenes* em 1940 no Instituto Pasteur em Paris (Farber e Peterkin, 2000). Em 1926, Murray e os seus colaboradores procederam ao isolamento de um microrganismo em forma de bacilo, designando-o por *Bacterium monocytogenes* por causar mononucleose em coelhos. Alguns anos mais tarde, Pirie isolou a bactéria de um gerbil selvagem no Norte de África e nomeou-a de *Listerella hepatolytica*. Quando em 1940, Pirie chegou à conclusão que *Bacterium monocytogenes* e *Listerella hepatolytica* eram o mesmo microrganismo, foi decidido mudar o nome para *Listeria monocytogenes* (Farber e Peterkin, 1991).

*L. monocytogenes* é reconhecido como microrganismo patogénico humano desde a década de 1930, tendo sido descrito pela primeira vez em 1936, quando foi documentado como responsável por bacteriemia e meningite em três crianças (Crum, 2002). No entanto, só passou a ser considerada uma fonte de preocupação e problemas para a saúde pública, indústria alimentar e agências reguladoras, quando em 1985 foi identificada como o agente causador de um surto de origem alimentar de grande repercussão causado por um queijo de pasta mole tipo mexicano (Farber e Peterkin, 2000). Desde então, inúmeros casos e surtos de infecção por *L. monocytogenes* relacionados com alimentos contaminados têm sido descritos no mundo inteiro.

### 1.1 Caracterização de *Listeria monocytogenes*

#### 1.1.1 Taxonomia e caracterização bioquímica

O género *Listeria* pertence à família *Listeriaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli* e divisão *Firmicutes* e contém seis espécies: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* e *L. welshimeri* (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

*L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bacilo pequeno e regular, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos (Farber e Peterkin, 1991) e com uma baixa percentagem de G + C (Seeliger e Jones, 1987).

Esta bactéria consegue crescer em ambientes com pH entre 5,6 e 9,6 preferindo, no entanto, um pH à volta de 7,5. É capaz de se adaptar a meios com baixo pH e, paralelamente, desenvolver uma protecção relativamente a outros factores adversos, como é o caso de elevadas concentrações de NaCl, sendo que algumas estirpes toleram um valor máximo de 10% de NaCl (Pintado, 2009).

Pode crescer em ambientes com temperaturas entre os 1 e 45 °C, tendo uma temperatura óptima de crescimento de 30 a 37 °C (Vasquez-Boland *et al.*, 2001; Seeliger e Jones, 1987). A sua mobilidade é conferida por 2 a 5 flagelos que se desenvolvem entre as temperaturas de 20 e 25 °C, e permitem que a bactéria se movimente para um ambiente preferencial quando está sob *stress* nutricional ou ambiental (Seeliger e Jones, 1987). A formação destes flagelos é inibida a 37 °C (Farber e Peterkin, 1991).

As características já referidas, tal como capacidade para crescer num leque alargado de temperaturas, em ambientes ácidos, na ausência ou em baixos níveis de O<sub>2</sub> e a sua capacidade para viver em biofilmes, permitem a persistência deste microrganismo em ambientes variados (Farber e Peterkin, 2000).

As bactérias desta espécie são catalase positiva, oxidase negativa e não produzem H<sub>2</sub>S (Vasquez-Bolande *et al.*, 2001). Em agar sangue, *L. monocytogenes*, apresenta uma β-hemólise incompleta, o que permite distinguir esta espécie das outras pertencentes ao mesmo género (Farber e Peterkin, 1991).

### 1.1.2 Estrutura antigénica

Com base nos seus antigénios somáticos (O) e flagelares (H), o microrganismo *L. monocytogenes* pode ser classificado em 4 serogrupos (1/2, 3, 4 e 7) e 13 serovares (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7) (Seeliger e Hohne, 1979). Embora a listeriose humana possa ser causada por qualquer um dos 13 serovares (Autio, 2003; Borucki e Call, 2003; Lund *et al.*, 2000; McLauchlin, 1990), alguns serovares (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b) são isolados mais frequentemente de casos clínicos e de alimentos (McLauchlin *et al.*, 2004).

A aplicação de vários procedimentos de subtipagem resultou na classificação de estirpes de *L. monocytogenes* em três linhagens. A linhagem I compreende os serovares 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, e é considerada a mais virulenta. As linhagem II (1/2a, 1/2c, 3a e 3c) e linhagem III (4c e 4a) são consideradas menos significativas, estando raramente associadas a casos de listeriose (Liu, 2006).

## 2. Listeriose

A infecção por *L. monocytogenes* é uma zoonose envolvendo animais de rebanho, como bovinos, ovinos e caprinos. Esta bactéria é ubíqua no meio ambiente, e é frequentemente encontrada nas fezes dos animais, solo, vegetação em decomposição, plantas, e água corrente. Foi também identificada nas fezes de 5% dos seres humanos saudáveis, onde é considerada uma colonizadora transitória do tracto intestinal (Crum, 2002). No entanto, quer animais quer seres humanos saudáveis podem ser portadores assintomáticos de *L. monocytogenes*.

*L. monocytogenes* é responsável por casos isolados e por surtos de uma doença grave designada por listeriose, que pode afectar quer humanos quer animais, e cuja taxa de mortalidade é cerca de 20-30% (de Valk *et al.*, 2003; Farber e Peterkin, 1991).

De entre as seis espécies de *Listeria*, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*, são conhecidas por serem patogénicas. *L. ivanovii* causa principalmente doenças em animais, mas alguns casos também foram relatados em seres humanos, enquanto *L. monocytogenes* causa listeriose em animais e seres humanos (Keto-Timonen, 2008; McLauchlin *et al.*, 2004; Vázquez-Boland *et al.* 2001).

### 2.1. Listeriose em humanos

*L. monocytogenes* pode causar listeriose invasiva e não-invasiva em humanos. A listeriose invasiva está geralmente associada a grupos de risco, tais como, grávidas e recém-nascidos, indivíduos de idade e pacientes com sistema imunitário enfraquecido, tais como, entre outros, doentes oncológicos, diabéticos, transplantados, com hepatite ou com HIV. A investigação de surtos recentes tem demonstrado que a infecção por *L. monocytogenes* também provoca gastroenterite febril, especialmente quando são ingeridas grandes quantidades do microrganismo. A listeriose não-invasiva pode também afectar pessoas saudáveis (Crum, 2002).

A infecção provocada por *L. monocytogenes* depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe, da quantidade de inóculo e da composição do alimento, como por exemplo o teor em sal, água disponível e acidez (McLauchlin *et al.*, 2004).

A infecção por *L. monocytogenes*, em humanos, pode ocorrer por várias vias entre elas aérea, cutânea, transplacentária, nosocomial, por contacto directo ou via digestiva, mas estudos de vigilância e investigação de surtos recentes, demonstraram que o tracto gastrointestinal é a via mais frequente de infecção por *L. monocytogenes* (McLauchlin *et al.*, 2004). Deste modo, o tracto gastrointestinal constitui o primeiro local onde esta bactéria se irá fixar, e como consequência, os sintomas associados à infecção são, numa fase inicial, semelhantes aos manifestados pelas restantes patologias infecciosas do tracto gastrointestinal (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Nos idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos, a listeriose manifesta-se principalmente sob a forma de infecção do sistema nervoso central, como por exemplo meningite e infecção sanguínea generalizada. Nas grávidas os sintomas confundem-se muitas vezes com síndrome gripal, ocorrendo a propagação da infecção da mãe ao feto, através da placenta, podendo provocar aborto (normalmente no final do segundo trimestre), ou o nascimento de bebés com patologias graves (Keto-Timonen, 2008). Deste modo, a despistagem da listeriose pode ser camuflada pelo tipo de sintomas, fazendo que a infecção possa progredir dando origem a quadros clínicos de maior gravidade, como é o caso da meningite. Este período infeccioso poderá ter uma duração de 20 a 30 dias (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). O tratamento da listeriose é feito através da combinação de ampicilina e gentamicina (Crum, 2002).

A listeriose atraiu atenção considerável durante a década de 1980 após uma série de grandes surtos alimentares e um aumento geral na incidência, tanto na Europa como nos Estados Unidos da América (EUA) (McLauchlin, 1996). Segundo Mead *et al.* (1999), estima-se que, anualmente, nos EUA., a listeriose seja responsável por 2500 casos em humanos e 500 mortes. É assim a segunda maior causa de morte identificada a partir de uma gastroenterite, logo a seguir à salmonelose (Mena *et al.*, 2003).

As taxas de infecção são maiores entre os adultos com idade superior a 60 anos e em crianças com menos de 1 mês de idade, o que poderá, provavelmente, estar relacionado com o declínio e imaturidade do sistema imunológico, respectivamente. As mulheres grávidas representam um terço dos casos, e seu risco para a infecção é 17 vezes maior que o da população em geral (Crum, 2002).

Nas últimas décadas têm sido reportados vários surtos de listeriose com consequências graves para a saúde pública. Por exemplo, um dos mais recentes, foi o surto ocorrido no Canadá em 2008, com 53 casos confirmados, 6 suspeitos e 20 mortes, devido ao consumo de carne processada, proveniente de uma das maiores empresas transformadoras de carne no Canadá (Warriner e Namvar, 2009).

Apesar de *L. monocytogenes* ser uma bactéria ubiqüitária e como tal, ser frequente a exposição a esta bactéria, a listeriose humana é uma doença rara. A incidência desta

bactéria na Europa é cerca de 3,4 casos por 1 milhão de habitantes por ano (de Valk *et al.*, 2003).

A listeriose não é uma doença de declaração obrigatória em Portugal, e por este motivo os dados referentes a esta doença são escassos, além disso o facto do quadro clínico da listeriose não ser característico dificulta o seu diagnóstico (Mena *et al.*, 2002). De acordo com Almeida *et al.* (2006), os dados relativos a 2003, indicam que a incidência da listeriose em Portugal foi na ordem dos 1,4 casos por milhão de habitantes. O aumento do número de casos de listeriose pode ser consequência, entre outras causas, do aumento população considerada como pertencente a grupos de risco, nomeadamente idosos e indivíduos imunocomprometidos tais como, infectados com HIV e doentes oncológicos. Por este motivo o número de casos pode não diminuir nos próximos anos.

### **2.1.1 Serovares envolvidos em listeriose**

São conhecidas diferenças geográficas na distribuição global dos serovares. Na maioria dos países europeus, predomina o serovar 4b. Nos EUA e no Canadá parece haver uma distribuição uniforme dos serovares 1/2a, 1/2b e 4b e na Austrália e Hungria há uma predominância dos serovares 1/2a e 1/2b (Farber e Peterkin, 1991; Lund *et al.*, 2000). Segundo estes autores não é conhecida a razão para esta diferente distribuição de serovares, nem a razão para estes três serovares (1/2a, 1/2b e 4b) aparecerem com mais frequência associados a listeriose, uma hipótese que se levanta é a de que estes serovares possam ser mais patogénicos que os outros.

Em Portugal, a maioria dos surtos e casos esporádicos têm sido associados ao serovar 4b (Almeida *et al.*, 2006).

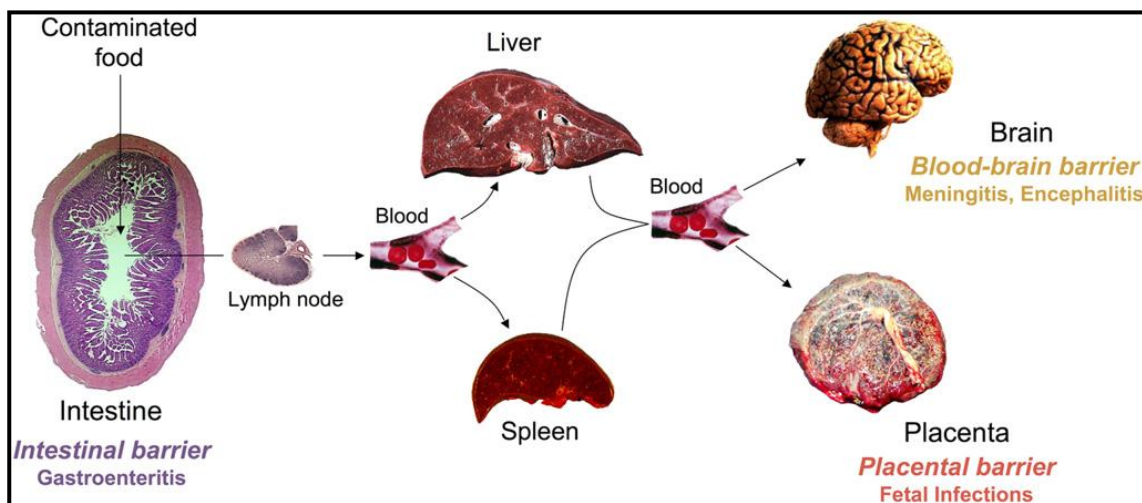
## **2.2. Dose infecciosa e mecanismos de infecção**

Embora o grau de virulência possa variar entre diferentes estirpes de *L. monocytogenes*, considera-se que todas as estirpes isoladas a partir de alimentos são virulentas. Não está ainda determinada a dose mínima infecciosa para humanos e, dependendo da estirpe e do estado imunitário do hospedeiro, esta dose pode variar. Alguns dados epidemiológicos sugerem que seja elevada. De acordo com Vázquez-Boland *et al.* (2001), os alimentos implicados nalguns surtos apresentam concentrações superiores a  $10^3$  células de *L. monocytogenes* por grama de alimento. O mesmo autor refere ainda que o

consumo de alimentos com concentrações de *L. monocytogenes* inferiores a  $10^2$  células por grama representa um baixo risco para o consumidor, no entanto, podem ser suficientes para causar toxinfecção em grupos de risco.

Como referido anteriormente, *L. monocytogenes* entra no organismo humano, principalmente, através da ingestão de alimentos, à excepção da contaminação nos recém-nascidos que pode ocorrer por via transplacentária ou durante o parto (Farber e Peterkin, 1991).

O processo de infecção por *L. monocytogenes*, devido à ingestão de alimentos contaminados, inicia-se com a colonização do tracto gastrointestinal, seguida da deslocação da bactéria para o fígado e multiplicação neste órgão (figura 1). Segue-se a infecção de outros tecidos, tais como a colonização da placenta e do feto ou a invasão do cérebro, o que pode conduzir, no primeiro caso, a aborto ou septicemia neonatal ou, no segundo caso, o desenvolvimento de meningite ou septicemia (Lecuit, 2007). A infecção causada por esta bactéria pode levar horas, semanas ou meses a manifestar-se.



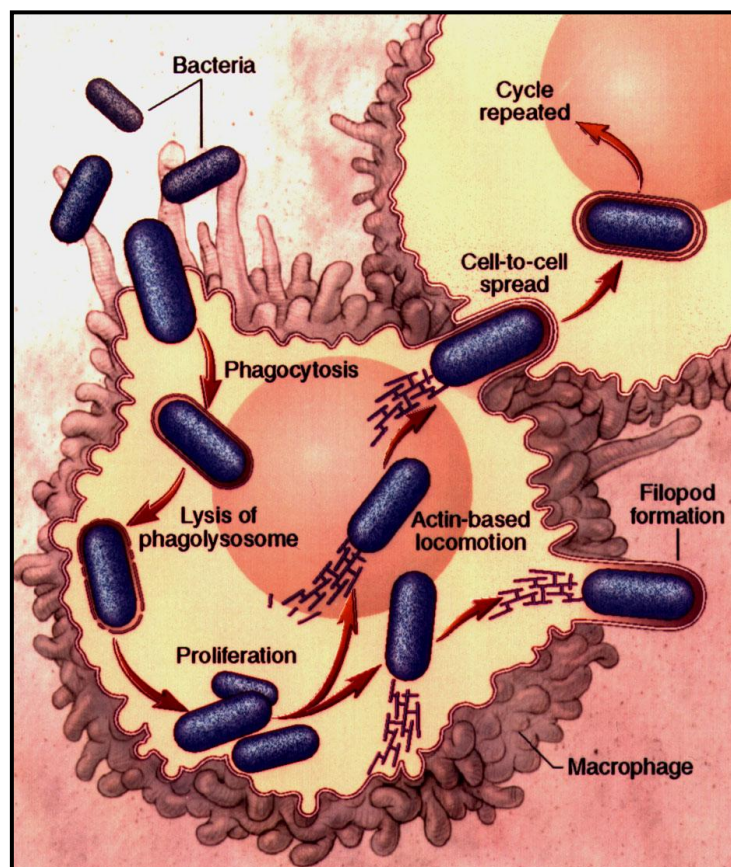
**Figura 1 - Percurso de infecção por *Listeria monocytogenes***

(Fonte: Lecuit, 2007)

### 2.2.1 Ciclo de infecção intracelular

No interior do organismo, *L. monocytogenes* tem a capacidade de induzir a sua própria internalização em células que normalmente não têm funções fagocitárias (Vázquez-Boland *et al.*, 2001), conseguindo transferir-se de célula em célula como se descreve em

seguida, sem contactar com o ambiente extracelular (figura 2). Para aderir e invadir as células do hospedeiro, esta bactéria utiliza várias proteínas conhecidas como invasivas ou internalinas (A e B), que interagem com receptores celulares de membrana que permitem a internalização da bactéria na célula hospedeira. No ambiente intracelular a bactéria secreta a proteína listeriolisina O, responsável pela sua capacidade de invasão e virulência, uma vez que é capaz de lisar o vacúolo fagocítico e transitar para o citoplasma. Ao ser libertada para o citoplasma a bactéria pode multiplicar-se através da proteína actina A, e utiliza os filamentos de actina para se deslocar até à membrana plasmática, formando uma “cauda de cometa”. Quando alcança a membrana induz a sua internalização na célula adjacente, e o ciclo volta a repetir-se na nova célula hospedeira, até chegar ao fígado. Através deste ciclo *L. monocytogenes* consegue deslocar-se de célula em célula, mantendo-se indetectável pelo sistema imunológico (Bania *et al.*, 2009; Olivares, 2009; Gandhi e Chikindas, 2007).



**Figura 2 - Processo de infecção por *Listeria monocytogenes***

(Fonte: Olivares (2009))

### **3. *Listeria monocytogenes* em alimentos**

#### **3.1. Principais fontes de contaminação**

A elevada incidência de *L.monocytogenes* em alimentos e a elevada taxa de mortalidade associada à listeriose, tem contribuído para que esta bactéria seja considerada um perigo para a saúde pública (Farber e Peterkin, 1991).

Como referido anteriormente, a espécie *L. monocytogenes* faz parte da flora do tracto gastrointestinal de alguns animais, tais como bovinos, ovinos, suínos e galináceos. No entanto, esta bactéria já foi igualmente isolada a partir de outro tipo de animais, entre os quais, crustáceos, ostras e alguns peixes (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). Esta bactéria também pode ser encontrada no solo, na vegetação e em águas residuais, de rios e de estuários, provavelmente devido a contaminações fecais (Rocourt *et al.*, 2000).

A presença de *L. monocytogenes* em diversos tipos de alimentos pode ser explicada pela presença desta bactéria em diversos tipos de animais, vegetais ou águas. Por este motivo a contaminação de matérias-primas e de alimentos não processados é frequente, sendo os alimentos não sujeitos a tratamentos térmicos, mais susceptíveis de permitir a presença desta bactéria. Assim esta bactéria tem sido detectada em vários alimentos, sendo os mais comuns: saladas, queijos feitos a partir de leite não pasteurizado, cogumelos, carne, salmão, molhos, patês, entre outros (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

A listeriose pode ter um longo período de incubação, muitas vezes mais do que 5 semanas, isto leva a que seja difícil identificar quais os alimentos suspeitos assim como a sua recolha para que se possa proceder à análise, uma vez que na maioria dos casos já foram consumidos ou eliminados (Guerra e Bernardo, 2004). Adicionalmente, pode ainda constituir um problema acrescido o facto de serem por vezes isoladas várias estirpes de *L. monocytogenes* em simultâneo de um alimento contaminado, o mesmo podendo acontecer no caso de um paciente com listeriose (Guerra *et al.*, 2001).

#### **3.2. Contaminação na indústria de processamento de alimentos**

O controlo de *L. monocytogenes* na indústria de processamento de alimentos é extremamente desafiador visto que o microrganismo sobrevive e cresce a temperaturas de refrigeração, tolera sal em elevada concentração, pH baixo e apresenta grande capacidade

para formar biofilmes em superfícies de equipamentos de processamento de alimentos difíceis de erradicar (Gandhi e Chikindas 2007).

Segundo Keto-Timonen (2008), alguns estudos sugerem que a contaminação pós-processamento é extremamente importante. Normalmente a origem da contaminação do produto acabado pode ocorrer nos equipamentos de processamento, particularmente na salga, no corte e na embalagem. Podem também surgir outras fontes de contaminação, por exemplo, mãos, calçado, luvas e fardamento dos manipuladores (Destro *et al.*, 1996). É de assinalar a capacidade de formação de biofilmes por *L. monocytogenes* nos ambientes de processamento, quer em superfícies quer nos equipamentos, que são de difícil remoção durante os processos de limpeza e desinfecção. Vários estudos têm mostrado que *L. monocytogenes* pode persistir nas unidades de processamento de alimentos durante longos períodos de tempo, até vários anos, indicando que a limpeza de rotina pode não conseguir eliminar o organismo (Wagner *et al.* 2006).

Para evitar a contaminação do produto, é essencial uma limpeza eficiente e rotinas de desinfecção, com especial atenção direccionada para o equipamento de processamento. Podem existir estirpes resistentes nas unidades, que apresentam características que favorecem a sua permanência, tais como a forte capacidade de aderência a superfícies de contacto com os alimentos e consequentemente aumento da formação de biofilmes e resistência a desinfectantes (Keto-Timonen, 2008; Borucki *et al.* 2003).

### **3.3. Alimentos mais frequentemente associados a infecções**

Os hábitos alimentares da sociedade ocidental têm vindo a alterar-se significativamente desde a década de 1990, caracterizando-se por um aumento do consumo de alimentos prontos-a-comer e de alimentos que exigem tempo de preparação mínimo. As refeições prontas são muitas vezes aquecidas em fornos microondas, o que pode aquecer o alimento de forma desigual, e caso a refeição esteja contaminada com *L. monocytogenes*, este pode sobreviver nos pontos mais frios e tornar-se num risco para a saúde do consumidor. A listeriose tem sido principalmente associada ao consumo de produtos pronto-a-comer que são armazenadas sob refrigeração por longos períodos de tempo (Keto-Timonen, 2008; Mena *et al.*, 2004; MacLauchlin, 1996).

O consumo de diversos alimentos, como saladas, patés, queijos, leite não pasteurizado, camarões e manteiga, tem sido associado a vários surtos de listeriose, nos últimos 30 anos. Como já referido, destes os que representam maior risco são aqueles cujo processo de fabrico não inclui qualquer etapa capaz de eliminar *L. monocytogenes* e cujas

matérias-primas apresentam elevadas concentrações da bactéria. Nesta categoria de produtos incluem-se o leite cru, os laticínios produzidos com leite cru, peixe fumado e alguns enchidos (Mena *et al.*, 2004).

### **3.4. Presença de *Listeria monocytogenes* em queijos**

*L. monocytogenes* tem sido isolada de leite cru e de queijos, mas os queijos de pasta mole e semi-mole são os que apresentam uma maior percentagem de isolados desta bactéria (Pintado, 2009). Como foi referido anteriormente, os ovinos, contêm *L. monocytogenes* como flora natural no seu tracto gastrointestinal, o que pode explicar a presença desta bactéria em queijos feitos a partir de leite cru (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

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, isto é, trata-se de um alimento pronto-a-comer, pode ser conservado durante longos períodos de tempo e é conservado a temperaturas de refrigeração (ILSI, 2005).

O consumo de queijo de pasta mole e semi-mole, está associado a alguns surtos de listeriose reportados na Europa e nos EUA, desde meados dos anos 80. Alguns dos queijos associados a surtos foram laborados com leite cru, por este motivo tem havido, desde então, alguma pressão para que seja proibida a produção deste tipo de queijos, o que já acontece nos EUA (Brito *et al.*, 2004).

Alguns queijos, de certas regiões de Portugal, apresentam-se frequentemente contaminados com *Listeria*. Pintado (2009) concluiu que a entrada de leite cru contaminado na queijaria constitui um dos pontos de contaminação por *L. monocytogenes*. Além disso, segundo Chambel *et al.* (2007) a incidência de *Listeria* é frequente nas queijarias durante o processo de fabrico, podendo ser encontrada em diferentes tipos de superfícies, incluindo o aço inoxidável, madeira e uma variedade de plásticos, indicando que todos os materiais estão em risco potencial de colonização por este microrganismo.

Num estudo levado a cabo por Pintado *et al.* (2008), foi provada a existência de relação epidemiológica entre uma estirpe de *L. monocytogenes* e a ocorrência de mastite sub-clínica numa ovelha. Foram encontradas estirpes idênticas em leite cru de ovelha com listeriose sub-clínica, em queijo de ovelha e no ambiente de processamento.

Chambel *et al.* (2007) confirmaram a presença de *L. monocytogenes* em laticínios de duas regiões distintas do país (região sul e Açores), verificando a prevalência do serovar 4b, seguido dos serovares 1/2b e 1/2a. Num estudo elaborado por Pintado *et al.* (2005),

foram isoladas estirpes de *Listeria* spp. em cerca de 75% dos queijos analisados, e destes 46% eram isolados de *L. monocytogenes*. Estes autores verificaram ainda a prevalência do serovar 4b.

A maior parte dos países industrializados implementou sistemas de vigilância a partir de 1987, em consequência dos surtos ocorridos, que demonstraram a importância da transmissão de doenças de origem alimentar. A partir desta data, a listeriose tem sido reportada por muitos países com sistema de vigilância implementada (Rocourt *et al.*, 2000). Na tabela 1 podem ver-se alguns surtos de listeriose que tiveram a sua origem no consumo de queijo.

**Tabela 1 - Surtos de listeriose associados ao consumo de queijo**

Ano	País	Alimento	Nº casos	Nº mortes
1985	EUA (Califórnia)	Queijo de pasta mole tipo "mexicano" (fabricado com leite não pasteurizado)	142 (93 grávidas)	48
1983-1987	Suíça (Cantón de Vaud)	Queijo pasta mole "vacherin"	122 (65 grávidas)	34
1986-1987	EUA (Filadélfia)	Queijo "brie"	36	16 (2 recém-nascidos)
1995	França	Queijo pasta mole	17 (11 grávidas)	4
2000-2001	EUA	Queijo tipo "mexicano" (fabricado com leite não pasteurizado)	12 (10 grávidas)	5
2001	Japão	Queijo	38	-
2002	Columbia Inglesa	Queijo tipo "camembert" e "tomme"	42	2
2003	EUA	Queijo fresco	12	-
2004-2007	EUA	Queijo fresco	135	22
2008	Canadá	Queijo pasta mole	23	1

Adaptado de: Warriner e Namvar (2009); Guerra e Bernardo (2004); McLauchlin *et al.* (2004)

### 3.4.1 Queijo de ovelha “Serra da Estrela”

O Queijo “Serra da Estrela” é um queijo curado, de pasta semi-mole, amanteigada, branca ou ligeiramente amarelada, produzido numa área geográfica delimitada, principalmente, entre os meses de Novembro e Março, com leite cru proveniente de ovelhas da raça Bordaleira Serra da Estrela e ou Churra Mondegueira. É obtido por esgotamento lento da coalhada após coagulação do leite cru pelo cardo (*Cynara cardunculus*, L.). O seu período de maturação tem normas específicas e é no mínimo de trinta dias. Após a maturação, os queijos devem ser armazenados a uma temperatura de cerca de 5 °C (Macedo *et al.*, 1993).

Segundo os mesmos autores, o queijo “Serra da Estrela” é uma das variedades mais apreciadas em Portugal e é economicamente a variedade mais importante dos queijos tradicionais fabricados em Portugal. É um queijo amplamente distribuído a nível nacional e o facto de ser um queijo com “Denominação de Origem Protegida” (DOP) acresce a sua importância económica.

Este tipo de queijos possui um pH baixo e elevada concentração de NaCl, condições que não impedem o desenvolvimento de *L. monocytogenes*.

A presença de *L. monocytogenes* nestes queijos pode dever-se à presença desta bactéria no leite cru, à contaminação na queijaria durante o processo de fabrico ou à contaminação pós-processamento. As baixas temperaturas vigentes durante o Inverno, na região onde são produzidos, ajudam a controlar a extensa contaminação microbiana que ocorre devido às más condições sanitárias durante o fabrico destes queijos (Macedo *et al.*, 1993). No entanto, como foi referido anteriormente, a temperatura baixa não é um factor de inibição para *L. monocytogenes*, que consegue crescer a temperaturas entre 1 e 45 °C.

Para garantir a produção de um queijo seguro e de boa qualidade é imprescindível um leite de boa qualidade sanitária e livre de microrganismos patogénicos. É importante fazer o controlo de infecções da mama (mamites) causadas por microrganismos patogénicos, pois embora não seja frequente, *Listeria* é um dos microrganismos que pode estar associado a esta doença (Pintado, 2009).

Relativamente ao processo de fabrico do queijo “Serra da Estrela”, são vários os pontos críticos a ter em atenção, embora os mais problemáticos possam ser, segundo Brito *et al.* (2004), as câmaras de maturação, equipamentos e utensílios, particularmente as tábuas de maturação, e a lavagem dos queijos. A contaminação nas câmaras de maturação é um dos principais problemas, devido ao facto do tempo de maturação ser longo e a temperatura baixa, condições que permitem que este microrganismo se multiplique mais rapidamente que outros microrganismos. Outro problema está relacionado com a

capacidade que este microrganismo tem para se alojar nas superfícies de equipamentos e utensílios, formando biofilmes difíceis de remover, sendo a maior problemática atribuída às tábuas de maturação que, devido à porosidade natural da madeira, não facilitam a sua limpeza. A lavagem de queijos é também um dos aspectos mais problemáticos relativamente à ocorrência de contaminações cruzadas entre queijos contaminados com *Listeria*.

#### **4. Tipagem de microrganismos**

##### **4.1. Importância da tipagem de microrganismos**

Os microrganismos envolvidos num surto têm normalmente uma origem comum, são normalmente membros da mesma espécie apresentando características genéticas, bioquímicas e, muitas vezes, factores de virulência idênticos (Olive e Bean, 1999). A capacidade de caracterizar e de estabelecer relações entre isolados bacterianos envolvidos em surtos epidémicos, é um pré-requisito para a realização de investigações epidemiológicas (Gautom, 1997). Para esclarecer a origem e disseminação de uma estirpe causadora de um surto infeccioso, determinar a via de transmissão e identificar estirpes virulentas é importante a utilização de métodos de tipagem que permitam a diferenciação e caracterização do organismo ao nível da sub-espécie ou da estirpe (Chen e Knabel, 2008 e Olive e Bean, 1999).

De acordo com Somer *et al.* (2005) a tipagem de estirpes bacterianas tem várias aplicações importantes em microbiologia: na área da clínica é útil para o diagnóstico e para determinar a estratégia de tratamento e é essencial para a identificação rápida de surtos de doenças e de novas estirpes virulentas; na área alimentar é importante para estabelecer a relação entre os casos e os alimentos suspeitos de toxinfecção alimentar e conseguir determinar e eliminar a fonte de infecção.

Como foi referido anteriormente, quando presente nos alimentos, *L. monocytogenes* pode causar doença grave denominada listeriose. Por este motivo, é importante a implementação de métodos de tipagem molecular que permitam encontrar a relação entre *L. monocytogenes* isolada de alimentos contaminados e de casos clínicos de listeriose (Liu, 2006).

## **4.2. Métodos de tipagem de microrganismos**

Os recentes avanços na biologia molecular resultaram no desenvolvimento de inúmeros métodos para detecção e tipagem de microrganismos ao nível do DNA, os quais diferem entre si pelo poder discriminatório, reprodutibilidade, sensibilidade, rapidez, intensidade de trabalho, complexidade e custo (Sommer *et al.*, 2005; Savelkoul *et al.*, 1999).

Com o objectivo de diferenciar estirpes de *L. monocytogenes*, podem ser utilizados métodos fenotípicos ou métodos genotípicos.

### **4.2.1 Métodos fenotípicos**

Os métodos fenotípicos são muito úteis na determinação do género e da espécie. No entanto, ao nível da sub-espécie ou estirpe são métodos muito limitados. Os métodos fenotípicos, baseados nas características observáveis, recorrem a testes morfológicos e bioquímicos, sensibilidade a fagos, sensibilidade a bacteriocinas, perfis imunológicos e perfis de susceptibilidade a agentes antimicrobianos. Incluem, entre outros, serotipagem e fagotipagem, sendo a serotipagem um dos métodos fenotípicos mais comuns (Chen e Knabel, 2008; Autio, 2003).

A serotipagem tem sido utilizada como uma ferramenta clássica na subtipagem de *L. monocytogenes* (Chen e Knabel, 2008). No entanto, na maior parte dos surtos de listeriose predominam apenas 3 serovares (1/2a, 1/2b, 4b), por este motivo, este método é considerado pouco discriminatório. Assim, a serotipagem é frequentemente usada como método de rastreio inicial, no entanto, tem um valor limitado em investigações epidemiológicas e por isso deve associar-se a outros métodos (a nível fenotípico e molecular) com a finalidade de se obter uma identificação mais detalhada (Corcoran *et al.*, 2006; Guerra e Bernardo, 2004; Autio, 2003).

### **4.2.2 Métodos genotípicos**

Os métodos genotípicos, também conhecidos como métodos de tipagem molecular, permitem a análise de uma parte ou da totalidade do genoma. A tipagem molecular de estirpes é o processo pelo qual uma espécie bacteriana pode ser separada em diferentes subgrupos ou estirpes. Os métodos genotípicos são baseados nas diferenças existentes nas

sequências de DNA de cada organismo e possibilitam por isso a diferenciação entre diferentes estirpes que pertencem ao mesmo gênero ou espécie (Olive e Bean, 1999).

Os métodos genotípicos podem ser usados para a caracterização da virulência das estirpes, para rastreamento de patógenos ao longo da cadeia alimentar e monitorização das alterações do patógeno ao nível do genoma ao longo do tempo e detectar fontes de toxinfecção alimentar (Corcoran *et al.*, 2006).

Farber (1996) refere que os métodos genotípicos oferecem diversas vantagens em comparação com os métodos fenotípicos convencionais, tais como: o DNA genómico é muito estável, não sendo afectado por condições ambientais e culturais que podem influenciar as características fenotípicas das bactérias; os métodos genotípicos têm maior poder discriminatório. Na tabela 2 pode ver-se um resumo de algumas características de vários métodos fenotípicos e genotípicos.

Na escolha de um método de tipagem molecular deve ter-se particular atenção às seguintes características: elevado poder discriminatório, ou seja capacidade de diferenciar claramente entre estirpes; reprodutibilidade, sendo capaz de reproduzir os mesmos resultados quando uma estirpe é repetidamente testada; tipeabilidade, isto é, capacidade de tipar todos os microrganismos (Olive e Bean, 1999).

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

Vários métodos genotípicos têm sido aplicados com sucesso na tipagem molecular de *L. monocytogenes* (Parisi *et al.*, 2009; Pintado, 2009; Neves *et al.*, 2008; Keto-Timonen, 2008; Somer *et al.*, 2005; Autio *et al.*, 2003; Keto-Timonen *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2001; Aarts *et al.*, 1999; Herman, 1997; Destro *et al.*, 1996). Segundo Corcoran *et al.* (2006) a combinação de métodos fenotípicos com genotípicos pode ser vantajoso na investigação de casos e surtos de listeriose, uma vez que os primeiros podem ser úteis para uma primeira despistagem, relativamente à existência de relação de semelhança entre estirpes, e os segundos para a confirmação das relações existentes.

**Tabela 2 - Características de métodos de tipagem de microrganismos**

	Métodos de Tipagem	Poder discriminatório	Concordância epidemiológica	Reprodutibilidade	Tipeabilidade	Custo
Fenotípicos	Serotipagem	Baixo	Baixa	Média	Média	Médio a elevado
	Fagotipagem	Baixo	Média a elevada	Média a elevada	Média	-
	Perfis plasmídicos	Baixo	Média a elevada	Média	Baixo	Baixo
	MEE	Moderado	Média	Elevada	Elevada	Médio
	RAPD	Moderado	Média	Média	Elevada	Médio
Genotípicos	Rep-PCR	Moderado	Média	Média a elevada	Elevada	Baixo
	MLVA	Elevado	Elevada	Média a elevada	Elevada	Médio
	PFGE	Elevado	Média a elevada	Média a elevada	Elevada	Médio
	AFLP	Moderado a elevado	Média	Média a elevada	Elevada	Médio
	PCR-RFLP	Moderado	Média	Média	Elevada	Médio
	Ribotipagem	Moderado	Média	Média	Elevada	Médio
	MLST	Moderado a elevado	Média a elevada	Elevada	Elevada	Médio a elevado
	MVLST	Elevado	Elevada	Elevada	Elevada	Médio a elevado

MEE– *Multilocus Enzyme Electrophoresis*; RAPD- *Random Amplified Polymorphic DNA*; Rep-PCR– *Repetitive-PCR*; MLVA- *Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis*; PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*; AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*; PCR-RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*; MLST- *Multilocus sequence typing*; MVLST- *Multi-virulence-locus sequence typing*.

(Adaptado de Chen e Knabel, 2008)

Segundo Chen e Knabel (2008) a introdução de métodos moleculares de subtipagem mudou muito o âmbito da epidemiologia e facilitou a compreensão da estrutura da população de *L. monocytogenes* e a evolução e transmissão deste microrganismo.

Actualmente são vários os métodos genotípicos utilizados, entre os quais se destacam os seguintes: ribotipagem; *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD); *Multiplex*; *Pulse Field Gel Electrophoresis* (PFGE); *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Chen e Knabel, 2008; Autio, 2003; Gibson, 1998).

A ribotipagem é um método rápido, suficientemente automatizado para minimizar o envolvimento do operador, no entanto requer um procedimento extenso. Segundo Graves *et al.* (1994), a capacidade da ribotipagem para discriminar as estirpes de serovar 1/2 b e 4b, pode não ser adequada para investigações epidemiológicas.

RAPD é um método discriminatório, cujo maior problema associado é a sua baixa reprodutibilidade (Chambel *et al.*, 2007).

De acordo com Brosh *et al.* (1994), PFGE é um método muito reprodutível para subtipagem de *L. monocytogenes*. O método PFGE é geralmente considerado o *gold standard* dos métodos moleculares de tipagem (Olive e Bean, 1999), pois é considerado o método de discriminação de estirpes mais sensível e é um dos mais utilizados para tipagem molecular de estirpes (Pintado, 2009). No entanto, requer equipamento e recursos humanos especializados e é relativamente demorado, o que pode reduzir a capacidade do laboratório em analisar um largo número de amostras e por isso não é usado rotineiramente para o rastreio inicial dos isolados (Corcoran *et al.*, 2006; Olive e Bean, 1999).

O método AFLP tem sido aplicado com sucesso na tipagem e classificação de estirpes (Savelkoul *et al.*, 1999; Gibson *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 1995). Este método tem a vantagem de ser rápido, altamente reprodutível, possuir elevada capacidade de resolução e poder ser aplicado ao DNA de qualquer origem e complexidade, sem que seja necessário um conhecimento prévio do DNA alvo (Pintado, 2009; Vos *et al.*, 1995). Vários estudos têm demonstrado que o AFLP é reprodutível e discriminativo, isto é, tem boa capacidade para diferenciar estirpes (Keto-Timonen *et al.*, 2003; Aarts *et al.*, 1999; Savelkoul *et al.*, 1999 e Gibson *et al.*, 1998).

### 4.3. *Amplified Fragment Length Polymorphism*

#### 4.3.1 Princípio do método AFLP

O método AFLP foi originalmente desenvolvido para a tipagem de espécies vegetais por Zabeu e Vos em 1993, e patenteado com a patente europeia 0534858A1 de propriedade da Keygene N.V. (Wageningen, Holanda) (Vos *et al.*, 1995). Actualmente, o método AFLP é aplicado para tipagem de DNA de origem vegetal, animal e procariótico (Gibson *et al.*, 1998).

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 3, envolve as seguintes etapas: (i) O DNA previamente extraído é digerido com duas enzimas de restrição, uma com uma frequência de corte média (ex. *EcoRI*) e a outra com elevada frequência de corte (ex. *MseI* ou *TaqI*), resultando centenas de fragmentos de restrição; (ii) 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; (iii) 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; (iv) Os fragmentos resultantes são separados por electroforese em gel poliacrilamida, obtendo-se um padrão com elevada informação de 20 a 400 bandas (Savelkoul *et al.*, 1999); (v) Os perfis de bandas obtidos a partir do gel são analisados visualmente ou através de *software* informático.

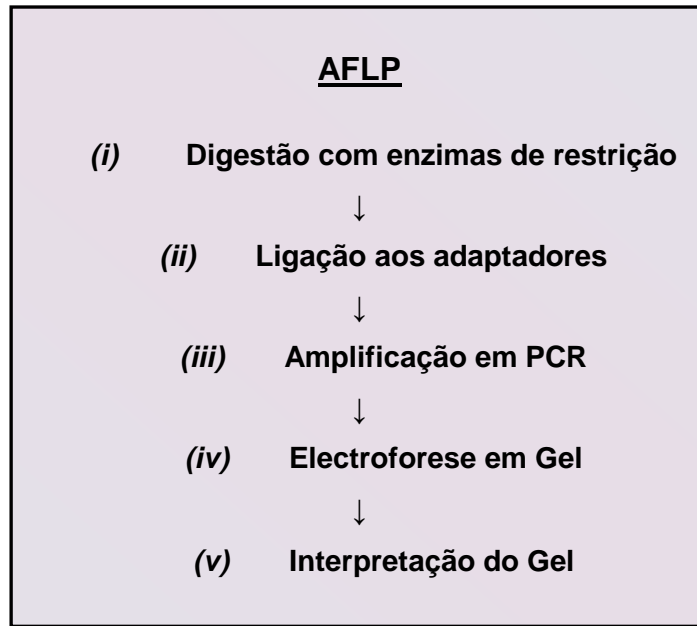


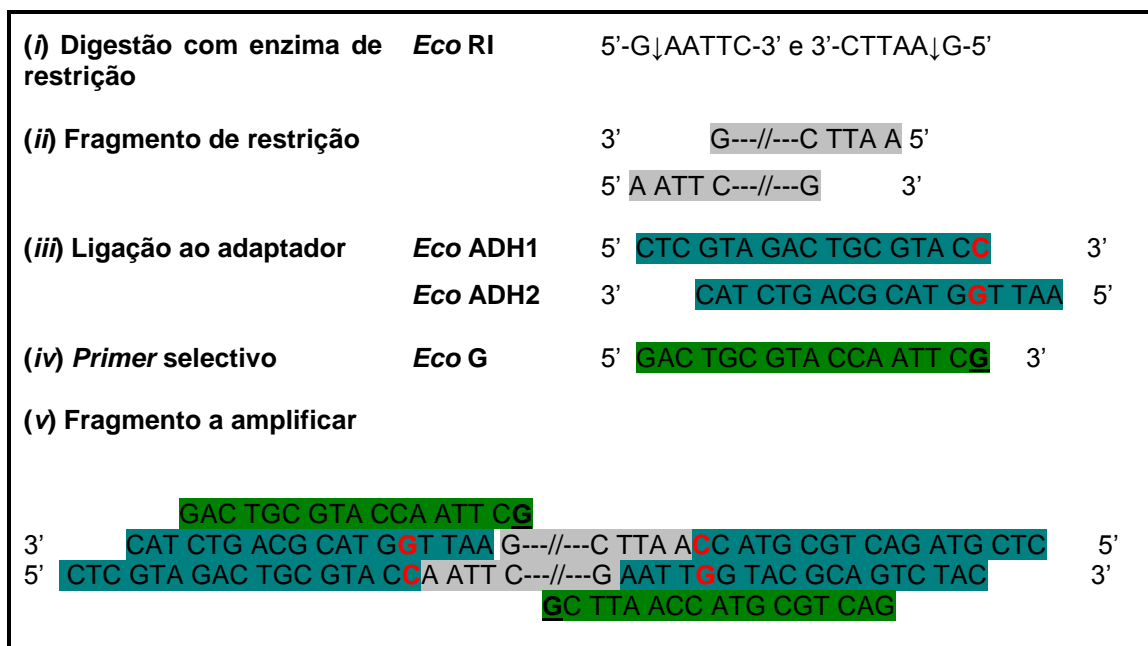
Figura 3- Etapas envolvidas no decorrer do método AFLP

#### 4.3.2 Modificações do método original

Segundo Keto-Timonen (2008) a combinação enzima e *primer* utilizada na análise tem influência sobre o poder discriminatório do AFLP e o protocolo AFLP deve ser adaptado a cada espécie bacteriana.

Uma alteração ao método inicialmente desenvolvido por Vos *et al.* (1995) foi descrita por Guerra *et al.* (2002) e por Gibson *et al.* (1998), para a aplicação do método na análise de *L. monocytogenes*. Esta alteração consiste na utilização de uma única enzima de restrição (*Eco* RI) e a separação dos fragmentos de restrição em gel de agarose (Guerra *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 1998).

O desenvolvimento do método AFLP, utilizando uma única enzima de restrição (*Eco* RI), tal como se pode ver na figura 4, envolve as seguintes etapas: reacção de digestão do DNA pela enzima *Eco* RI; ligação do fragmento de restrição ao adaptador (*Eco* ADH1 e *Eco* ADH2); obtenção do fragmento a ser amplificado por PCR, usando o *primer Eco* G (Pintado, 2009; Guerra *et al.*, 2002; Gibson *et al.*, 1998).



**Figura 4- Método AFLP utilizando a enzima de restrição *Eco* RI.**

Exemplificação da reacção de digestão/ligação ao adaptador e obtenção do fragmento pronto a ser amplificado na reacção PCR. (i) A enzima de restrição *Eco* RI corta o DNA nos locais de restrição, indicados pela seta. (ii) Fragmento de restrição obtido após a digestão com *Eco* RI. (iii) 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. (iv) *Primer* utilizado para reacção de amplificação. O nucleótido sublinhado é a base selectiva inserida no *primer*. (v) Fragmento pronto a amplificar numa reacção PCR.

(Adaptado de Pintado (2009) e Gibson *et al.* (1998))

Neste caso, os padrões resultantes pela aplicação do método AFLP, com uma enzima de restrição, são mais fáceis de interpretar uma vez que apenas algumas bandas são obtidas (Keto-Timonen, 2008). Segundo Guerra *et al.* (2002) para *L. monocytogenes* os perfis produzidos pela *Eco* R1, quando utilizado o *primer Eco* G, apresentam entre cinco e oito bandas de DNA de dimensões aproximadas de 500 até 1450 pares de base (bp). Verifica-se também que todas as culturas de *L. monocytogenes* apresentam uma banda de DNA comum com cerca de 850 bp (Pintado, 2005).

Após a amplificação, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose. Os fragmentos num intervalo de dimensão adequada, são seleccionados para análise. Normalmente, os pequenos fragmentos de peso molecular inferior a 200-400 bp e superior 1300-2000 bp são removidos da análise (Guerra *et al.* 2002).

Guerra *et al.*, em 2002, concluíram que os resultados obtidos com a aplicação do método AFLP, com as alterações introduzidas pelos mesmos, para subtipagem de *L. monocytogenes*, eram congruentes com os obtidos por serotipagem e fagotipagem.

#### 4.3.3 Análise de dados obtidos por tipagem molecular

Segundo Chen e Knabel (2008) têm sido desenvolvidos diferentes *softwares* informáticos para identificar a relação entre estirpes, com base em dados gerados por vários métodos de tipagem molecular. Estes dados resultantes da tipagem de estirpes são, muitas vezes, usados como base para apoiar descobertas durante investigações de surtos epidemiológicos (Chen e Knabel, 2008). Numa situação de surto, se o número de perfis AFLP for limitado, os padrões podem ser analisados visualmente, no entanto quando são feitas comparações por longos períodos de tempo é vantajosa uma análise assistida por computador (Keto-Timonen, 2008).

Savelkoul *et al.* (1999) definiram intervalos de similaridade. Assim, 90 a 100% de homologia representa estirpes idênticas, entre 60 e 90% consideram que as estirpes são diferentes mas pertencentes às mesmas espécies, de 40 a 60% a homologia é obtida entre diferentes espécies, e com uma homologia inferior a 40% consideram que os isolados pertencem a géneros diferentes.

## 5. Enquadramento geral e objetivos

Como já foi referido, o consumo de alimentos contaminados com *L. monocytogenes* pode provocar doença grave (listeriose). Este microrganismo pode afectar qualquer pessoa, no entanto os grupos de maior risco incluem mulheres grávidas, fetos e recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos.

Embora não se conheçam relatos da ocorrência de surtos de listeriose em Portugal, *L. monocytogenes* é frequentemente isolada de queijos, o que leva vários autores a considerarem estes produtos como de elevado risco (Pintado, 2009). Como a listeriose não é uma doença de declaração obrigatória em Portugal, os dados relativos à ocorrência de *L. monocytogenes* no nosso país são escassos, não se conhecendo a situação real nesta matéria (Almeida *et al.*, 2006).

O trabalho prático que serviu de base à realização desta dissertação decorreu no Laboratório de Microbiologia inserido no Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). Neste laboratório desenvolvem-se actividades na área da segurança alimentar, nomeadamente no que se refere a prevenção de doenças de origem alimentar, através da vigilância e da prestação de serviços diferenciados, relativamente à contaminação microbiológica dos alimentos prontos a consumir e à identificação dos factores potencialmente responsáveis por essa contaminação. Além disso, o laboratório é também solicitado para a análise de amostras suspeitas em casos e surtos de toxinfecções alimentares.

É prática do Laboratório de Microbiologia do DAN, perante uma suspeita de toxinfecção alimentar, efectuar a pesquisa de microrganismos tendo em atenção o tipo de alimento envolvido na suspeita e os sintomas apresentados pelos doentes que consumiram o alimento em causa. No entanto, não estavam implementadas, neste laboratório, métodos de tipagem molecular que permitissem relacionar estirpes encontradas nos alimentos e nos doentes. O Laboratório de Microbiologia tinha, por isso, necessidade de identificar e implementar um método para caracterizar e relacionar estirpes de *L. monocytogenes* encontradas nos alimentos com as de origem clínica, de modo a facilitar o esclarecimento de casos e surtos de toxinfecções alimentares.

O presente trabalho foi desenvolvido no período compreendido entre Maio e Dezembro de 2009, iniciando-se com a pesquisa bibliográfica e identificação dos reagentes e material necessários para o desenvolvimento do método AFLP. Seguiu-se um estágio, que decorreu entre Junho e Julho de 2009, no Laboratório de Microbiologia das Águas do INSA, onde já estavam implementadas técnicas de biologia molecular. Este período teve como objectivo a familiarização com técnicas de biologia molecular, equipamentos utilizados para esta área e boas práticas de manuseamento de materiais, reagentes e equipamentos de biologia molecular. Posteriormente, foram criadas as condições necessárias para a implementação do método AFLP no Laboratório de Microbiologia do DAN. Para isso, foi disponibilizada, no DAN, uma sala onde foram colocados os equipamentos necessários ao desenvolvimento deste método.

Os objectivos deste trabalho foram:

- Implementar o método de tipagem molecular AFLP no laboratório de Microbiologia dos Alimentos;
- Avaliar a reprodutibilidade do método AFLP entre laboratórios testando 10 estirpes de *L. monocytogenes* de perfil conhecido;

- Caracterizar a diversidade genotípica de 27 estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de queijo de ovelha da Serra da Estrela e 28 estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de casos de listeriose humana de vários pontos do país;
- Estudar a possível associação entre as estirpes de origem alimentar com as de origem humana.

## II MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Isolados bacterianos

Foi utilizado, neste estudo, um total de 65 isolados de *Listeria*. Dez destes isolados, com perfil AFLP conhecido, serviram de base à implementação do método AFLP (tabela 3), de entre os quais 9 eram isolados de *L. monocytogenes* (5 de queijo de ovelha da região de Castelo Branco, 1 de queijo de ovelha de Tolosa, 2 de leite de ovelha cru e 1 de referência do *National Collection of Typical Cultures*, HPA, U.K (NCTC 11994)) e 1 isolado de *L. innocua* de leite de ovelha cru.

Vinte e sete dos isolados de *L. monocytogenes*, utilizados neste trabalho, são provenientes de queijo de ovelha de pasta semi-mole “Serra da Estrela” (tabela 4). Estes isolados fazem parte da colecção de culturas do Instituto Superior de Agronomia, tendo sido obtidos no âmbito de um projecto (Agro 292), o qual incluiu a pesquisa de *L. monocytogenes* em queijos de ovelha “Serra da Estrela” recolhidos em 24 explorações produtoras de queijo, entre Março de 2002 e Junho de 2003. Neste trabalho foram caracterizados os isolados com serovares 1/2a, 1/2b e 1/2c.

Foram também usados neste estudo 28 isolados de *L. monocytogenes*, com origem em casos clínicos de listeriose (tabela 5). Estes isolados de origem humana foram cedidos por hospitais de 3 regiões do país, sendo 15 da região centro, 9 da região norte e 4 da região sul.

**Tabela 3 – Isolados de *Listeria* com perfil AFLP conhecido**

Referência	Origem	Espécie	Ano de isolamento	Serovar	Grupo serovar (PCR)	Perfil AFLP
M37	Queijo Castelo Branco	<i>L. monocytogenes</i>	1995	ND	1/2b, 3b,7	XV
M38	Queijo Castelo Branco	<i>L. monocytogenes</i>	1995	1/2a	1/2a, 3a	XIV
M44	Queijo Castelo Branco	<i>L. monocytogenes</i>	1995	ND	1/2b, 3b,7	IV-1
M52	Queijo Castelo Branco	<i>L. monocytogenes</i>	1995	4b	4b, 4d, 4e	I
M39	Queijo Castelo Branco	<i>L. monocytogenes</i>	1995	ND	4b, 4d, 4e	IV-1
PM6	Queijo Tolosa	<i>L. monocytogenes</i>	1998	4b	4b, 4d, 4e	IV-1+1
D3	Leite de ovelha cru	<i>L. innocua</i>	2000	6b	---	XX
D6	Leite de ovelha cru	<i>L. monocytogenes</i>	2000	4b	4b, 4d, 4e	V
D15	Leite de ovelha cru	<i>L. monocytogenes</i>	2000	1/2b	1/2b, 3b,7	II
ISA 3001 / NCTC11994	Queijo tipo mole	<i>L. monocytogenes</i>	---	4b	4b, 4d, 4e	V

Legenda: ND – Não determinado

**Tabela 4- Isolados de *Listeria monocytogenes* de queijo de ovelha “Serra da Estrela”**

Referência	Espécie	Data de isolamento	Proveniência (Exploração)	Serovar
ISA 3130	<i>L. monocytogenes</i>	9-7-2002	B	1/2a
ISA 3063	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2002	B	1/2b
ISA 3064	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2002	B	1/2b
ISA 3065	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2002	B	1/2b
ISA 3066	<i>L. monocytogenes</i>	2-4-2002	B	1/2b
ISA 3067	<i>L. monocytogenes</i>	2-4-2002	B	1/2b
ISA 3068	<i>L. monocytogenes</i>	2-4-2002	B	1/2b
ISA 3081	<i>L. monocytogenes</i>	30-4-2002	B	1/2b
ISA 3083	<i>L. monocytogenes</i>	30-4-2002	B	1/2b
ISA 3085	<i>L. monocytogenes</i>	30-4-2002	B	1/2b
ISA 3119	<i>L. monocytogenes</i>	4-6-2002	B	1/2b
ISA 3120	<i>L. monocytogenes</i>	4-6-2002	B	1/2b
ISA 3124	<i>L. monocytogenes</i>	28-5-2002	B	1/2b
ISA 3125	<i>L. monocytogenes</i>	28-5-2002	B	1/2b
ISA 3276	<i>L. monocytogenes</i>	15-1-2003	G	1/2b
ISA 3277	<i>L. monocytogenes</i>	15-1-2003	G	1/2b
ISA 3278	<i>L. monocytogenes</i>	15-1-2003	G	1/2b
ISA 3230	<i>L. monocytogenes</i>	26-11-2002	E	1/2c
ISA 3231	<i>L. monocytogenes</i>	26-11-2002	E	1/2c
ISA 3239	<i>L. monocytogenes</i>	26-11-2002	E	1/2c
ISA 3240	<i>L. monocytogenes</i>	26-11-2002	E	1/2c
ISA 3582	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2003	E	1/2c
ISA 3603	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2003	E	1/2c
ISA 3641	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2003	E	1/2c
ISA 3659	<i>L. monocytogenes</i>	26-3-2003	E	1/2c
ISA 3880	<i>L. monocytogenes</i>	16-6-2003	E	1/2c
ISA 3900	<i>L. monocytogenes</i>	16-6-2003	E	1/2c

**Tabela 5 - Isolados de *Listeria monocytogenes* de origem humana de 3 regiões do país**

Referência	Espécie	Data de isolamento	Proveniência (Região)	Serovar
ISA 3845	<i>L. monocytogenes</i>	31-03-2000	Centro	4b
ISA 3846	<i>L. monocytogenes</i>	15-06-2000	Centro	4b
ISA 3847	<i>L. monocytogenes</i>	13-04-2000	Centro	4b
ISA 3848	<i>L. monocytogenes</i>	16-10-2000	Centro	4b
ISA 3849	<i>L. monocytogenes</i>	14-03-2002	Centro	1/2b
ISA 3850	<i>L. monocytogenes</i>	24-05-2001	Centro	4b
ISA 3851	<i>L. monocytogenes</i>	07-11-2001	Centro	1/2b
ISA 3852	<i>L. monocytogenes</i>	13-01-1999	Centro	4b
ISA 3853	<i>L. monocytogenes</i>	20-09-1999	Centro	4b
ISA 3855	<i>L. monocytogenes</i>	09-09-1997	Centro	4b
ISA 3856	<i>L. monocytogenes</i>	24-07-1997	Centro	4b
ISA 3857	<i>L. monocytogenes</i>	20-10-1997	Centro	4b
ISA 3858	<i>L. monocytogenes</i>	08-04-1998	Centro	4b
ISA 3859	<i>L. monocytogenes</i>	16-07-1999	Centro	4b
ISA 3860	<i>L. monocytogenes</i>	25-02-2003	Centro	4b
A - INSA_L	<i>L. monocytogenes</i>	2000	Sul	ND
B - INSA_L	<i>L. monocytogenes</i>	2000	Sul	ND
C - INSA_L	<i>L. monocytogenes</i>	2000	Sul	ND
D - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	13-06-2003	Norte	ND
E - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	13-06-2003	Norte	ND
F - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	21-10-2003	Norte	ND
G - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	03-05-2004	Norte	ND
H - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	13-06-2003	Norte	ND
I - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	13-06-2003	Norte	ND
J - INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	28-11-2003	Norte	ND
K- INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	16-06-2003	Norte	ND
L- INSA_P	<i>L. monocytogenes</i>	21-10-2003	Norte	ND
M- INSA_L	<i>L. monocytogenes</i>	07-11-2009	Sul	ND

Legenda: ND – Não determinado

## 2. Constituição da colecção de trabalho

Após a recepção dos isolados de *Listeria* no Laboratório de Microbiologia, foram repicadas colónias para meio de enriquecimento líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) e foram a incubar em estufa de 37 °C durante 24 ± 2 h.

A partir do meio BHI procedeu-se ao isolamento, com ansa, de cada cultura em 3 tubos inclinados com meio sólido *Tryptone Soya Agar* (TSA) (Laboratoires AES™, Bruz, França) e incubaram-se a 37 °C durante 24 ± 2 h. Os tubos foram posteriormente conservados a 4 °C até ao momento da sua utilização. A partir do BHI, cada cultura foi transferida com ansa para 3 tubos de *Trypticase Soya Broth* (TSB) + 20% glicerol, que foram guardados em câmara de congelação a -80 °C.

## 3. Confirmação das características culturais e da pureza

Antes de proceder à extracção de DNA, a partir do meio TSA em tubo inclinado repicaram-se e inocularam-se as culturas em meio sólido *Agar Listeria* segundo Ottaviani & Agosti (ALOA) (Laboratoires AES™, Bruz, França) para confirmar as características da espécie *L. monocytogenes*. As colónias características de *L. monocytogenes* apresentam, neste meio, um halo opaco, que as distingue das outras espécies pertencentes a este género (figura 5). Paralelamente, para obtenção de colónias puras e isoladas inocularam-se as culturas em *Tryptone Soya Agar* (TSA) e em *Colombia Agar* com 5 % de sangue de cavalo (COH) (bioMerieux® SA, Marcy L'Étoile, França), para verificar a produção de hemólise. As placas assim obtidas foram incubadas em estufa a 37 °C durante 24 ± 2 h, sendo confirmadas, após este período, as características de *L. monocytogenes* assim como a pureza das culturas.

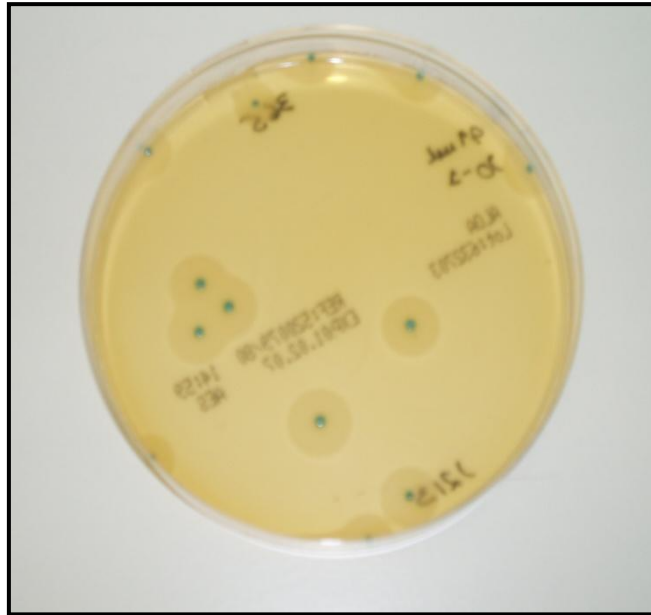


Figura 5- Colónias características de *Listeria monocytogenes* em meio ALOA

#### 4. Extracção de DNA

Para efectuar a extracção de DNA foi utilizado o *kit* de extracção *Mo Bio UltraClean™ Microbial DNA Isolation* (Diversilab™, bioMérieux, inc., USA) (figura 6). Este *kit* é constituído por 3 diferentes tipos de microtubos e pelas seguintes soluções: solução MicroBead (contém sais e um tampão que estabiliza e homogeniza a dispersão das células microbianas antes da lise); solução MD1 (contém dodecil sulfato de sódio (SDS) e outros reagentes necessários para a lise celular); solução MD2 (contém um reagente para precipitar restos celulares e proteínas de matérias orgânicas e inorgânicas, para permitir a remoção da contaminação que pode reduzir a pureza do DNA); solução MD3 (é uma solução altamente concentrada de sal, condição necessária para ligar o DNA à membrana do *Spin Filter* na etapa seguinte); solução MD4 (solução de lavagem com etanol para limpar o DNA que está ligado à membrana do *Spin Filter*. Esta solução de lavagem remove os resíduos de sal, e outros contaminantes, permitindo que o DNA permaneça ligado à membrana do *Spin Filter*); solução MD5 (tampão de eluição isento de sal que passa através da membrana do *Spin Filter*, permitindo a libertação do DNA, pois este só fica na membrana na presença de sal).



Figura 6- Kit para extração de DNA Mo Bio UltraClean™

A partir das placas de TSA, referidas no ponto anterior, retiraram-se com ansa cerca de 10 µl de cultura fresca. As células foram transferidas para um tubo *MicroBead* contendo 300 µl de solução *MicroBead*, e adicionaram-se 50 µl de solução MD1. Homogeneizou-se a solução obtida no homogeneizador (*IKA® Vortex – Genius 3*) durante 10 min à velocidade máxima e de seguida centrifugou-se em centrífuga (*Eppendorf 58 4R*) durante 30 seg à velocidade de 10000 x g. Transferiu-se em seguida o sobrenadante para microtubo de 2,0 ml contendo 100 µl de solução MD2. Homogeneizou-se durante 5 seg e incubou-se durante, no mínimo, 15 min a 4 °C. Centrifugou-se 1 min a 10000 x g. Num novo microtubo de 2,0 ml adicionou-se 450 µl da solução MD3 e 200 µl do sobrenadante do passo anterior. Homogeneizou-se esta mistura e procedeu-se a uma centrifugação rápida. Para um tubo contendo um filtro (tubo *Spin Filter*) pipetaram-se 650 µl da solução anterior que se centrifugou durante 30 seg a 10000 x g. Retirou-se o filtro, eliminou-se o sobrenadante e recolocou-se o filtro no mesmo microtubo. Adicionaram-se 300 µl de solução MD4 e centrifugou-se durante o mesmo período de tempo e à mesma velocidade. Depois de eliminar o sobrenadante recolocou-se o filtro no mesmo microtubo e voltou a centrifugar-se durante 60 seg a 10000 x g. De seguida, eliminou-se o sobrenadante e o microtubo, ficando o DNA no filtro. Colocou-se o filtro num novo microtubo de 2,0 ml e adicionaram-se 35 µl da solução MD5. Efectuou-se uma centrifugação final por 30 seg a 10000 x g e eliminou-se o filtro. Guardou-se o tubo contendo o DNA bacteriano extraído a -20 °C.

## 5. Amplified Fragment Length Polymorphism

### 5.1 Preparação dos adaptadores e do *primer*

Na tabela 6 podem visualizar-se as características dos adaptadores *Eco* ADH1, *Eco* ADH2 e *primer Eco* G (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland) usados neste método.

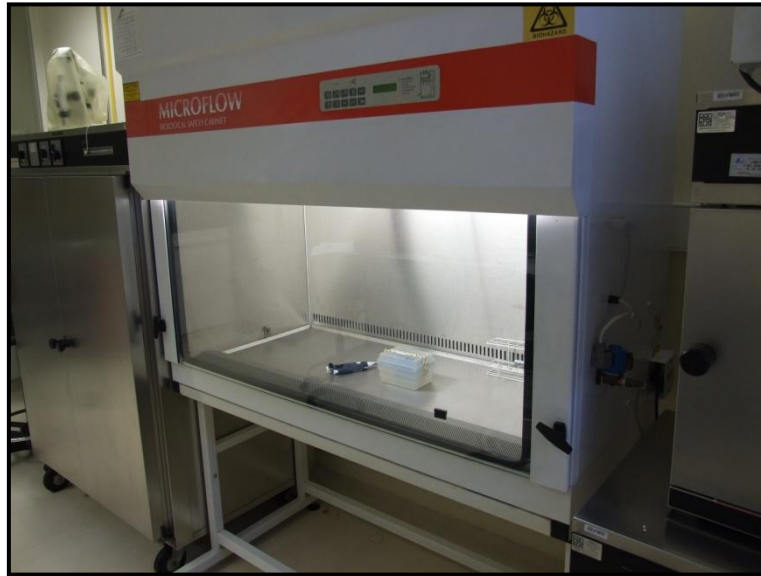
Tabela 6 -Características dos adaptadores *Eco* ADH1 e *Eco* ADH2 e *primer Eco* G

Nome	Sequência	Concentração inicial (solução stock)	Concentração final (solução de trabalho)
<b>Adaptador:</b> <i>Eco</i> ADH1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	100 µM	10 µM
<b>Adaptador:</b> <i>Eco</i> ADH2	5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'	100 µM	10 µM
<b>Primer:</b> <i>Eco</i> G	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CG-3'	100 µM	10 µM

Os adaptadores e o *primer* são comercializados sob a forma liofilizada e foram reconstituídos com água bidestilada estéril, de acordo com as instruções que acompanham os reagentes, ficando com uma concentração inicial de 100 µM.

Para aplicação deste método é requerida uma concentração de 10 µM para cada um dos adaptadores e para o *primer*. Por este motivo constituíram-se soluções de trabalho de 10 µM. Assim, pipetaram-se 10 µl da solução *stock* para um *ependorf* de 1,5 ml e juntaram-se 90 µl água bidestilada estéril.

Todos estes trabalhos foram realizados na câmara de segurança biológica equipada com Ultra-Violetas (U.V.) (figura 7).



**Figura 7- Câmara de segurança biológica**

## **5.2 Reacção de digestão de DNA com enzima de restrição e ligação aos adaptadores**

### **5.2.1 Preparação da mistura para a reacção de digestão/ligação**

Num tubo *ependorf* de 1,5 ml preparou-se a mistura para a reacção de digestão de DNA com enzima de restrição *Eco* RI (Metabion International AG, Martinsried, Deutschland) e ligação aos adaptadores *Eco* ADH1 e *Eco* ADH2, na presença da T4 DNA *ligase buffer* e T4 DNA *ligase* (Invitrogen, Carlsbad, USA), de acordo com o indicado na tabela 7.

**Tabela 7 - Mistura para a reacção de digestão de DNA e ligação aos adaptadores**

Reagentes	Concentração stock	Concentração final	Mistura para 1 tubo eppendorf
Água bidestilada estéril			12 µl
<i>Eco</i> RI	10 U/µl	100 U	10 µl
T4 DNA ligase buffer	5 X	---	4 µl
<i>Eco</i> ADH1	100 µM	10 µM	4 µl
<i>Eco</i> ADH2	100 µM	10 µM	4 µl
T4 DNA ligase	1 U/µl	1 U	1 µl
<b>Volume final</b>			<b>35 µl</b>

Retiraram-se 35 µl da mistura anterior para um tubo de 0,2 ml e juntaram-se 5 µl do DNA extraído, como referido no ponto 4.

Preparou-se um controlo negativo com 5 µl de água bidestilada estéril e 35 µl de volume da mistura anterior.

### 5.2.2 Digestão de DNA e ligação dos adaptadores

O que se escreve em seguida é o resultado de ensaios em que se testou a utilização de banhos de água e do termociclador na reacção de digestão de DNA e ligação aos adaptadores, com o objectivo de otimizar as condições de ensaio.

Os tubos contendo a mistura de reacção e o DNA foram colocados no termociclador Gene Amp® - PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA) (figura 8) e programou-se o termociclador para a etapa de digestão de DNA seguida de ligação aos adaptadores, de acordo com as condições descritas na tabela 8.

**Tabela 8 - Etapas da reacção de digestão de DNA / ligação aos adaptadores**

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duração</b>
Incubação	37 °C	90 min
Inactivação	80 °C	10 min
Arrefecimento	4 °C	

### **5.3 Reacção de amplificação em termociclador**

#### **5.3.1 Diluição da solução contendo os fragmentos de restrição**

Efectuou-se a diluição da solução contendo os fragmentos de restrição, obtidos no ponto anterior, em tubos *ependorf* de 0,5 ml, juntando 8 µl de água bidestilada estéril com 2 µl da solução obtida no ponto anterior.



**Figura 8 – Termociclador Gene Amp® - PCR System 9700 (Applied Biosystems)**

### 5.3.2 Preparação da mistura para a reacção de amplificação

Num tubo *ependorf* de 1,5 ml preparou-se a mistura para a reacção de amplificação em termociclador, conforme indicado na tabela 9.

**Tabela 9 - Mistura para a reacção de amplificação em termociclador**

Reagentes	Concentração stock	Concentração final	Mistura para 1 tubo eppendorf
Água bidestilada estéril			16,5 µl
<b>Eco G</b>	100 µM	10 µM	2,5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	50 mM	1 µl
<b>Volume total</b>			20 µl

Foram distribuídas aliquotas de 20 µl da mistura preparada anteriormente para tubos de 0,2 ml *puReTaq<sup>TM</sup> Ready-to-go<sup>TM</sup> PCR beads* (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom), que contêm na sua constituição dNTPs (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e DNA polimerase. De seguida adicionaram-se 5 µl da solução, contendo os fragmentos de restrição, obtida no ponto 5.2.

### 5.3.3 Amplificação dos fragmentos de restrição em termociclador

Colocaram-se os tubos para PCR no termociclador e programou-se o termociclador para que a amplificação dos fragmentos ocorra nas condições descritas na tabela 10.

**Tabela 10** - Etapas para amplificação de fragmentos de restrição em termociclador

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Duração</b>	<b>Ciclos</b>
Pré - desnaturação	94 °C	4 min	1
Desnaturação	94 °C	1 min	
Hibridação	60 °C	1 min	35
Extensão	72 °C	2,5 min	
Arrefecimento	4 °C		1

Temperatura da tampa: 105 °C

## **6. Electroforese em gel de agarose**

O que vai ser descrito em seguida resultou de vários ensaios em que se testaram diferentes condições (percentagem de agarose, voltagem, concentração de corante GelRed™), com o objectivo de otimizar as condições de ensaio.

### **6.1 Preparação das soluções de trabalho**

#### **6.1.1 Solução azul de bromofenol**

Para a preparação da solução de indicador de corrida, juntaram-se 3 ml de glicerol (Appllichem GmbH, Denamarc) a 25 mg de indicador azul de bromofenol (Acros organics, Belgium) e perpez-se o volume até 10 ml com água bidestilada estéril.

#### **6.1.2 Solução de marcador**

Preparou-se uma solução de trabalho com 100 µl de volume total, contendo 20 µl de solução de azul bromofenol (preparada como descrito em 6.1.1), 75 µl de água bidestilada estéril e 5 µl de marcador 100bp DNA *Ladder* (1 µg/ µl) (Invitrogen, Carlbad, USA).

### **6.1.3 Solução para coloração do gel**

Para a solução corante juntou-se 2,34 g de NaCl (Riedel de Haen, Seelze, Denamarc), 80 µl de *GelRed<sup>TM</sup> Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium, Hayward, USA) e perpez-se até 400 ml de água destilada.

### **6.1.4 Tampão Tris-Acetato-EDTA 1x**

O tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50x, para o gel de agarose e tina de electroforese, foi diluído na proporção de 1:50. Para tal adicionaram-se 490 ml de água destilada a 10 ml de tampão TAE 50x.

### **6.1.5 Gel de agarose 2%**

Foi preparado um gel de agarose a 2% com 70 ml de tampão TAE 1x e 1,4 g de agarose Seakeam® LE (Lonza, Rockand, EUA). Fundiu-se o gel no microondas durante 2 min à potência de 700 W. Deixou-se arrefecer sem deixar solidificar.

Verteu-se o gel de agarose fundido no tabuleiro de 10 cm x 15 cm, da tina de electroforese Wide Mini-sub Cell GT (BioRad, Hemel Hempstead, United Kingdom), onde se tinha já colocado o pente de 15 dentes. Deixou-se solidificar o gel de agarose, retirou-se o pente e cobriu-se o gel com tampão TAE 1x para evitar a desidratação do gel.

## **6.2 Preparação das amostras e aplicação no gel**

Para a optimização da corrida electroforética, utilizou-se a solução de marcador DNA *Ladder*, no gel de agarose, devido ao facto deste ter a vantagem de possuir um perfil conhecido.

Para a caracterização das amostras procedeu-se como descrito em seguida. Misturaram-se 15 µl da amostra amplificada em termociclador com 2 µl de solução azul de bromofenol.

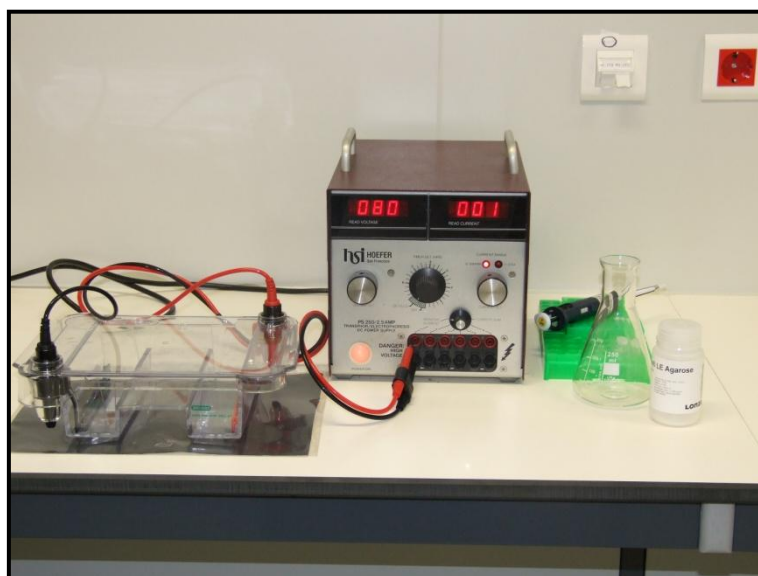
Encheram-se os poços do gel com 10 µl de cada amostra e com 10 µl de solução de trabalho de marcador, com mostra a figura 9.

M	1	2	3	4	5	6	M	7	8	9	10	C.P.	C.N.	M
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	------	------	---

**Figura 9 – Posição das amostras e do marcador no gel de agarose**

M – Marcador; C.P. – Controlo Positivo; C.N. – Controlo Negativo; 1 a 10 - Amostras

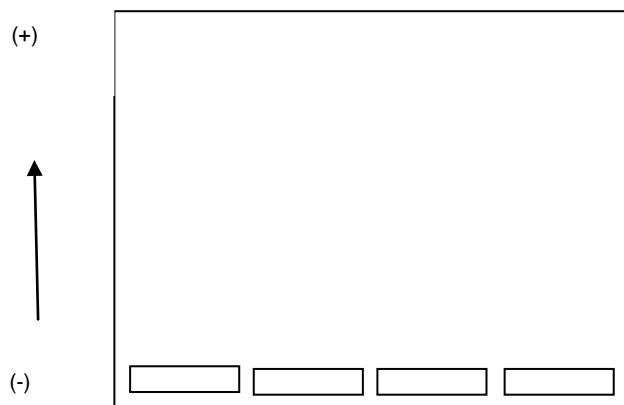
### 6.3 Electroforese



**Figura 10 – Tina de electroforese e respectiva fonte de alimentação**

Para a corrida electroforética, ligaram-se os cabos da fonte de alimentação à tina de electroforese, como mostra a figura 10, de modo que a migração do DNA, que tem carga negativa, ocorra na direcção do pólo positivo (figura 11).

Seleccionou-se a voltagem (80 V) e ligou-se a fonte de alimentação. A electroforese decorreu durante 1h 30min.



**Figura 11- Sentido da migração dos fragmentos de DNA em direcção ao pólo positivo**

#### **6.4 Coloração do gel**

Após a electroforese, procedeu-se à coloração do gel de agarose, mergulhando o gel na solução corante *Gel Red*<sup>TM</sup>, ao abrigo da luz, durante 10 min.

#### **7. Revelação do gel de agarose**

A revelação do gel foi feita através do transiluminador *UV transillumination* (BioRad<sup>TM</sup>) no sistema *Gel Doc 2000* e a imagem foi visualizada através do *Software Quantity One*. A imagem de cada gel foi guardada sob o formato *Tiff*.

#### **8. Análise com o software BioNumerics**

A imagem do gel guardada em formato *Tiff* foi analisada com o software BioNumerics®, versão 3.5, (Applied Maths, Belgium). A semelhança entre as amostras foi estimada pelo coeficiente de Dice e a partir da matriz de similaridade obteve-se o dendrograma pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means*).

Todas as imagens foram normalizadas utilizando as bandas 600 bp, 1000 bp e 1500 bp como posições de referência externa.

### III RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 65 isolados de *L. monocytogenes* de queijo, de leite cru e de casos clínicos foram submetidos a análise pelo método AFLP.

Destes, 9 isolados (de queijo e de leite cru) serviram como base para a montagem do método e para avaliar a reprodutibilidade interlaboratorial. A estirpe de referência (ISA 3001 - NCTC 11994) serviu também para a determinação da reprodutibilidade interna.

Após a implementação do método, foram caracterizados neste trabalho 27 isolados de *L. monocytogenes* de amostras de queijo de ovelha “Serra da Estrela” e 28 de origem clínica de três regiões distintas do país, cujas datas de isolamento se sobrepõem parcialmente com as datas de isolamento dos isolados alimentares. Foi aqui investigada a existência de eventuais relações entre as estirpes de queijos “Serra da Estrela” e de origem humana, uma vez que o queijo de pasta mole apresenta frequentemente contaminação por *L. monocytogenes* e é consumido em todo o território nacional.

Foi utilizado o programa *Bionumerics*, o qual facilitou a análise dos resultados obtidos pelo método AFLP, permitindo a construção de dendrogramas, o que segundo Chambel *et al.* (2007) pode ser muito útil quando usado um grande número de estirpes. Os dendrogramas permitiram agrupar os isolados em *clusters*, considerando-se que fazem parte do mesmo *cluster* estirpes idênticas entre si.

#### 1. Implementação e otimização do método

O método AFLP decorreu desde o início sempre nas mesmas condições, à excepção das condições da reacção de digestão e ligação aos adaptadores. Foram utilizados, no início, 2 banhos de água, um a 37 °C e outro a 80 °C. Posteriormente abandonou-se esta prática e passou-se a fazer esta reacção em termociclador, visto ser mais prática e fiável em termos de variação de temperatura e tempo de exposição a estas temperaturas.

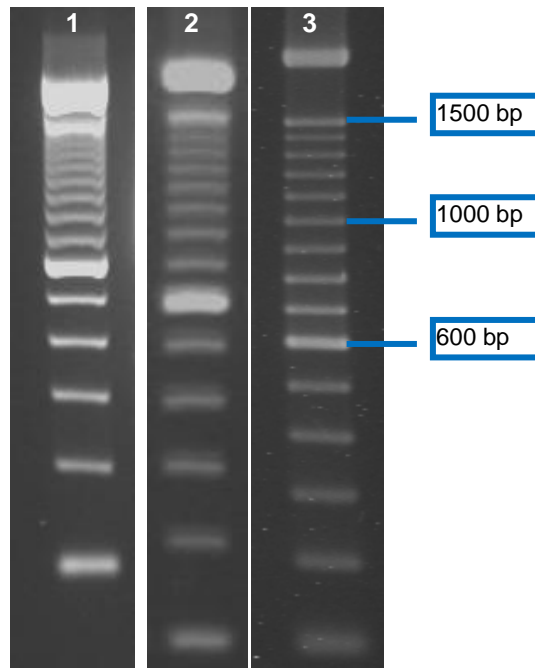
Os resultados obtidos inicialmente por electroforese em gel de agarose não foram os ideais, pois as bandas de maior peso molecular não se distinguiam umas das outras, tornando-se difícil a sua identificação. Por isso, para a optimização dos resultados obtidos por electroforese foram testadas várias condições até à obtenção da condição ideal. O marcador utilizado, 100 bp DNA *Ladder* (Invitrogen) apresenta um perfil de bandas com

pesos moleculares conhecidos. É constituído por 15 fragmentos de extremidades cegas entre 100 bp e 1500 bp em múltiplos de 100 e um fragmento adicional com 2072 bp. A banda com 600 bp é aproximadamente 2 a 3 vezes mais brilhante do que as restantes bandas, com excepção da banda de 2072 bp, tal como é demonstrado no perfil número 3 da figura 12.

Na fase de optimização testaram-se diferentes concentrações de agarose (1%, 1,5% e 2%), não se tendo verificado uma diferença notória na separação das bandas. Apesar disso, optou-se por se fazer a electroforese num gel de agarose a 2%, visto ser esta a indicação do fabricante do marcador.

Quando se testaram diferentes voltagens (60 V, 70 V e 80 V), não se notaram melhorias significativas na separação das bandas, variando apenas o tempo de corrida. Assim, e de forma a minimizar o tempo de corrida da electroforese, Optou-se pela voltagem de 80 V.

Foram também testadas várias concentrações do corante *GelRed*<sup>TM</sup> incorporado no gel de agarose (1:10, 1:50 e 1:100). Verificou-se uma melhor separação aquando do uso de uma concentração de 1:100, no entanto, este não foi considerado um resultado ideal (perfil 2, figura 12). O melhor resultado foi conseguido quando se corou o gel após a electroforese, usando-se uma solução corante com o *GelRed*<sup>TM</sup>, tendo-se optado por esta última condição.



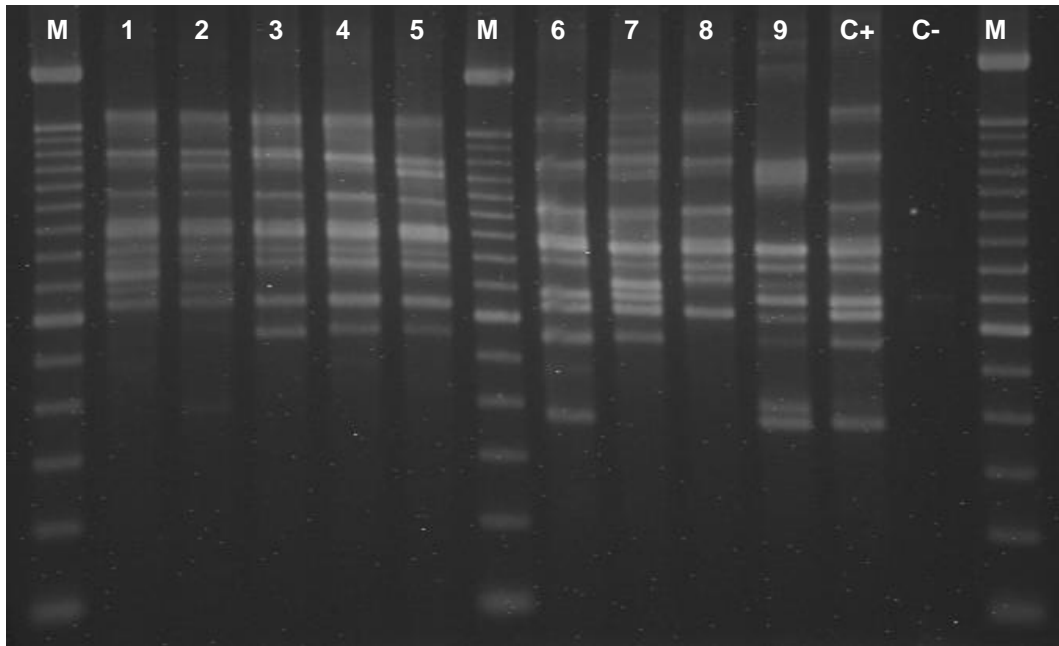
**Figura 12- Perfil do marcador de 100bp *DNA Ladder* (Invitrogen) em gel de agarose**  
 1- Gel de agarose incorporado de *GelRed*<sup>TM</sup> na proporção de 1:10; 2- Gel de agarose incorporado de *GelRed*<sup>TM</sup> na proporção de 1:100; 3- Gel de agarose corado com *GelRed*<sup>TM</sup> após electroforese.

## 2. Reprodutibilidade

### 2.1 Reprodutibilidade interlaboratorial

Dez isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos a tipagem molecular por AFLP, seguindo o método descrito no capítulo II (Materiais e métodos), com o objectivo de analisar a reprodutibilidade do método AFLP entre laboratórios distintos. Estas 10 amostras tinham sido analisadas anteriormente por AFLP por Pintado (2005), sendo por isso conhecidos os seus perfis AFLP.

A reprodutibilidade interlaboratorial foi confirmada por análise visual, comparando os perfis dos vários isolados observados no gel da figura 13 com os perfis AFLP obtidos por Pintado, quando utilizou os mesmos isolados. Observam-se perfis idênticos quando são comparadas as bandas com pesos moleculares entre 400 e 1500 bp.



**Figura 13 - Perfis AFLP das estirpes de *L. monocytogenes* (perfis 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e *L. innocua* (perfil 9) usadas na implementação do método AFLP**

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; **M**- Marcador de 100 bp

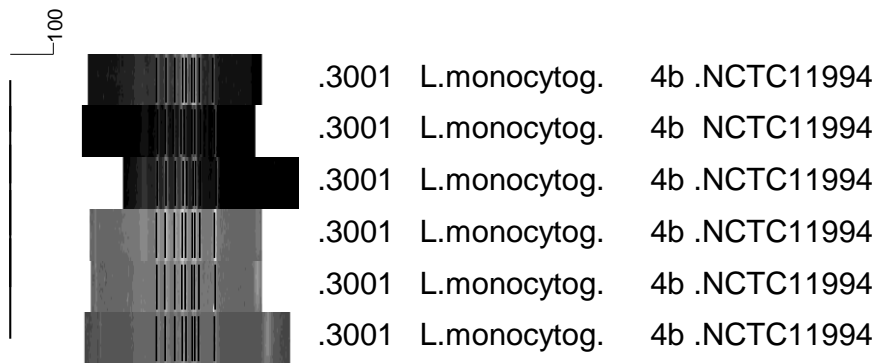
Confirma-se assim o referido por Keto-Timonen *et al.* (2003) de que a reprodutibilidade do método AFLP é elevada, obtendo-se perfis semelhantes, para estirpes de referência, obtidos em diferentes electroforeses.

## 2.2 Reprodutibilidade interna

A reprodutibilidade interna dos ensaios foi avaliada através da utilização de uma estirpe referência (ISA 3001 - NCTC 11994) de perfil conhecido que foi sendo 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 14) a semelhança entre perfis obtidos em diferentes géis é de 100%.

Dice (Opt:3.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]

**AFLP AFLP**



**Figura 14- Dendrograma resultante da análise por AFLP, da estirpe de *Listeria monocytogenes* 3001 (NCTC 11994), obtida em diferentes electroforeses**

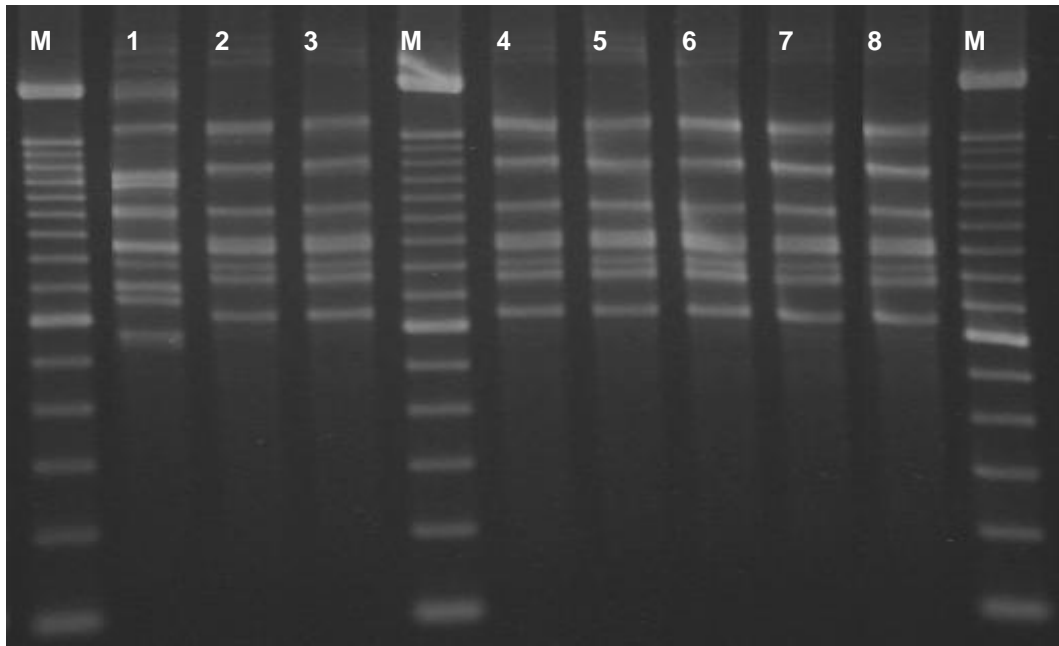
Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente de Dice.

Nos controlos negativos, nos quais foi utilizado água em vez de lisado celular, não foi detectada amplificação de produtos, confirmando a ausência de contaminações.

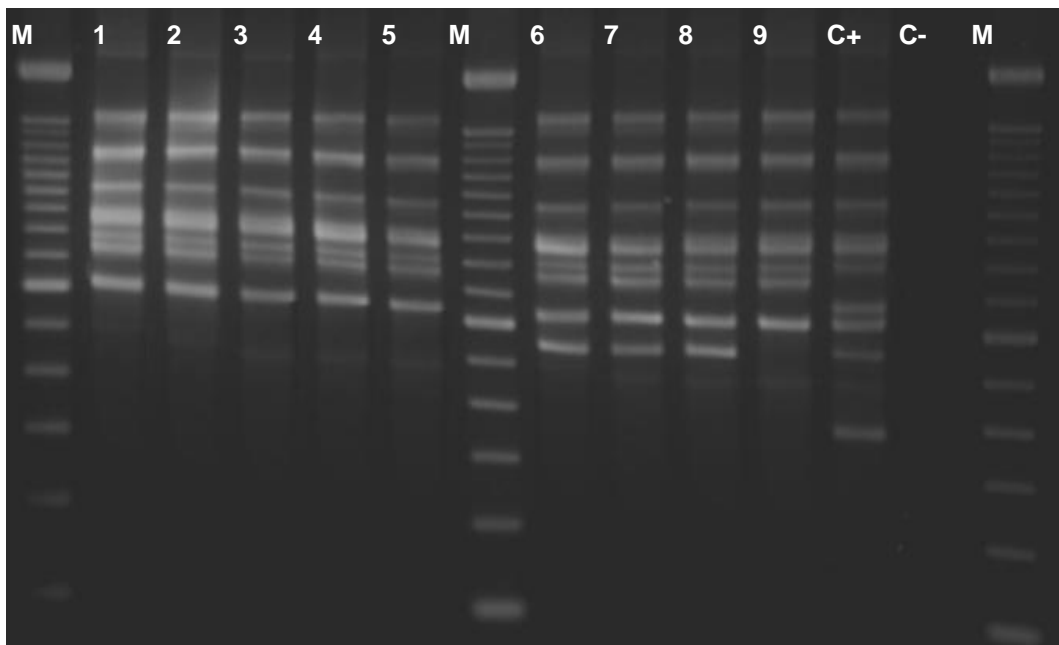
### **3. Estirpes de *Listeria monocytogenes* de queijo de ovelha “Serra da Estrela”**

Os 27 isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha “Serra da Estrela” foram submetidos a análise pelo método AFLP, de acordo com o descrito no capítulo II (Materiais e métodos). Os perfis obtidos, para cada estirpe, podem ser observados pelas fotos obtidas a partir da revelação dos géis de agarose, que se encontram nas figuras 15, 16 e 17.

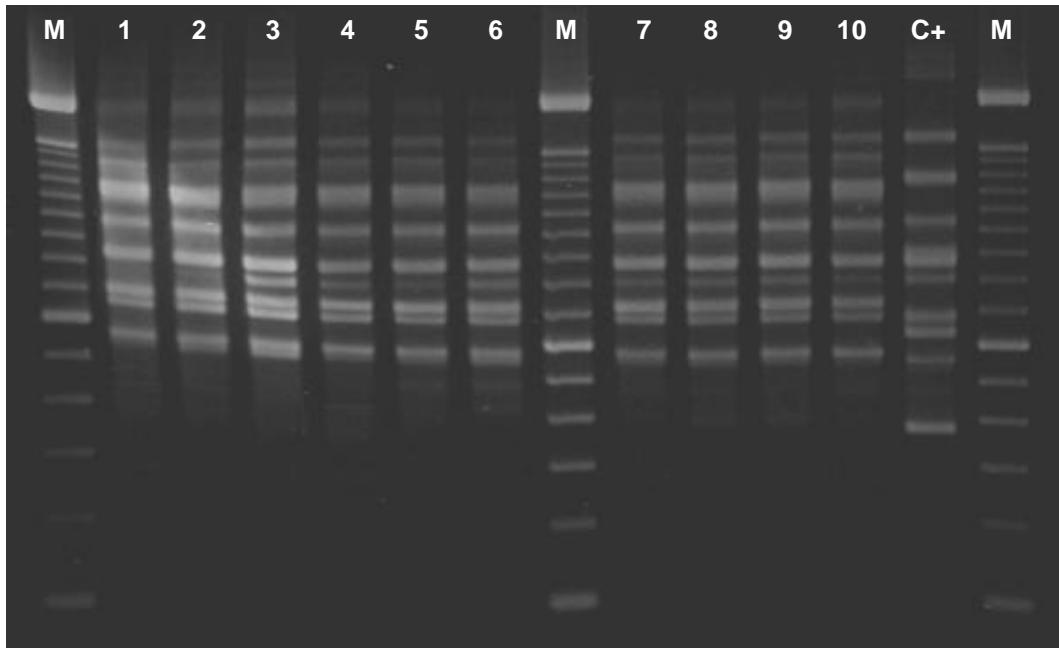
O número de bandas por perfil variou de 7 a 11, e o peso molecular das bandas variou, aproximadamente, entre 400 bp e 1500 bp. Verifica-se a existência de uma banda comum a todas os perfis com 850 bp, aproximadamente.



**Figura 15 - Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo “Serra da Estrela”**  
 1- ISA 3130; 2- ISA 3063; 3- ISA 3064; 4- ISA 3065; 5- ISA 3066; 6- ISA 3067; 7- ISA 3068; 8- ISA 3081; **M**- Marcador de 100 bp.



**Figura 16- Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo “Serra da Estrela”**  
 1- ISA 3083; 2- ISA 3085; 3- ISA 3119; 4- ISA 3120; 5- ISA 3124; 6- ISA 3276; 7- ISA 3277; 8- ISA 3278; 9- ISA 3125; **C(+)**- ISA 3001; **C(-)**- Controlo negativo; **M**- Marcador de 100bp



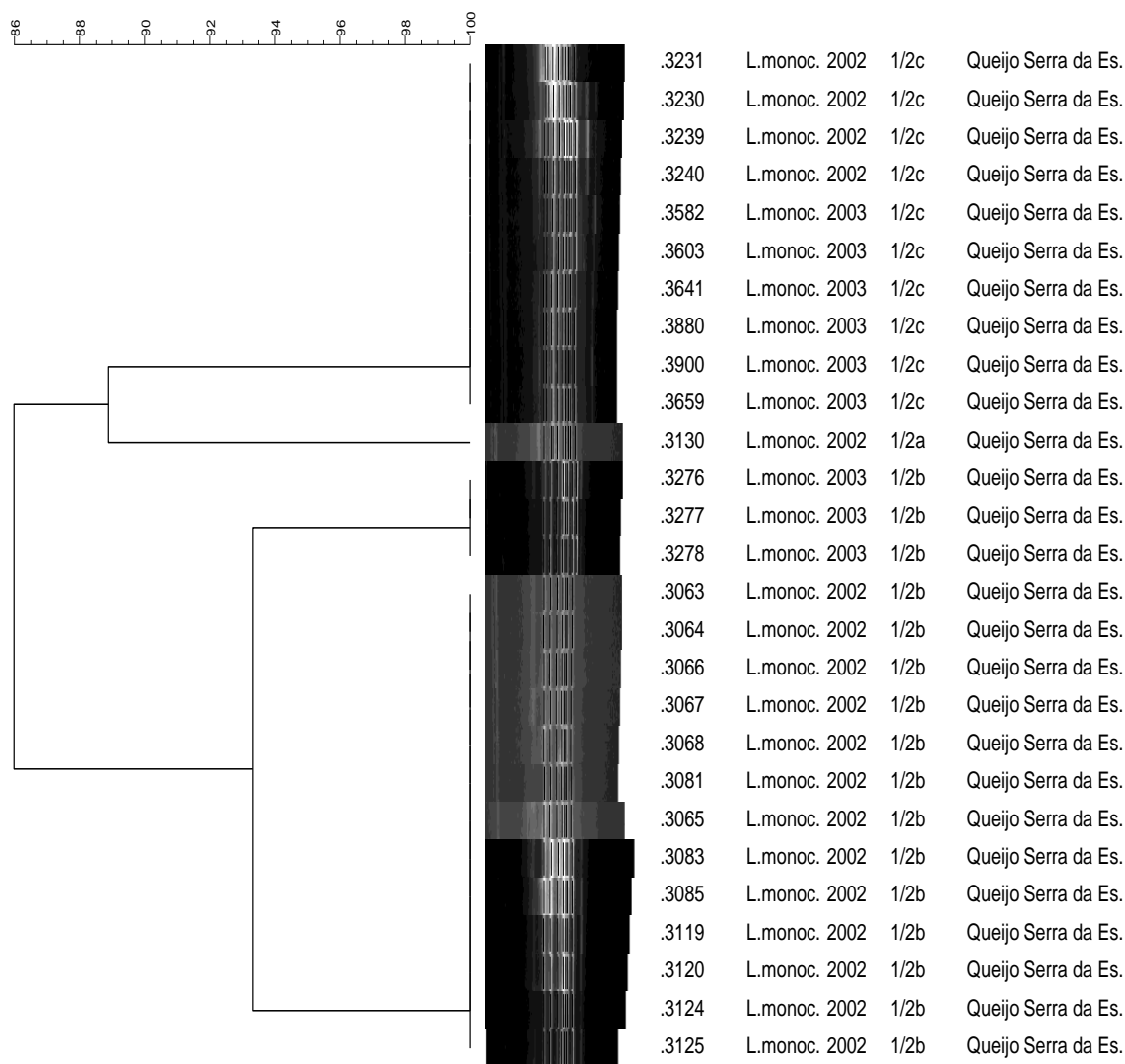
**Figura 17- Perfis AFLP dos isolados de *L. monocytogenes* de queijo “Serra da Estrela”**

1- ISA 3230; 2- ISA 3231; 3- ISA 3239; 4- ISA 3240; 5- ISA 3582; 6- ISA 3603; 7- ISA 3641; 8- ISA 3659; 9- ISA 3880; 10- ISA 3900; **C(+)**- ISA 3001; **M**- Marcador de 100bp.

As fotos obtidas foram gravadas em formato *tiff*. e analisadas através do programa informático Bionumerics. Através deste programa, os isolados de *L. monocytogenes* do queijo de ovelha “Serra da Estrela” foram agrupados em *clusters*, num dendrograma, que permitem caracterizar a diversidade genotípica destes isolados, relacionando os isolados entre si e atribuindo uma percentagem de semelhança entre eles. O seguinte dendrograma mostra as relações existentes entre os 27 isolados de *L. monocytogenes* do queijo “Serra da Estrela” (figura 18).

Dice (Opt:3.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
**AFLP**

**AFLP**



**Figura 18 - Dendrograma resultante da análise por AFLP, dos isolados de *Listeria monocytogenes* de queijo “Serra da Estrela”**

Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente de Dice.

Pela análise da figura 18, verifica-se que os isolados de *L. monocytogenes* de queijo de ovelha “Serra da Estrela” se agrupam em 4 *clusters*. Um destes *clusters* abrange apenas uma estirpe (1/2a), ao passo que cada um dos outros três *clusters* reúne várias estirpes. Dentro de cada um dos três *clusters*, as estirpes apresentam 100% de semelhança entre si.

O primeiro *cluster* engloba os 10 isolados de *L. monocytogenes* com serovar 1/2c, o segundo *cluster* tem apenas um isolado com serovar 1/2a, do terceiro *cluster* fazem parte 3 isolados com serovar 1/2b e o quarto *cluster* engloba 13 isolados com serovar 1/2b. Os 4 *clusters* foram agrupados na tabela seguinte (tabela 11).

**Tabela 11- Relação entre os *clusters* obtidos por AFLP, o serovar e a exploração de origem dos isolados de queijo “Serra da Estrela”**

<b>Cluster AFLP obtido por</b>	<b>Nº de isolados por <i>cluster</i></b>	<b>Serovar</b>	<b>Exploração de origem</b>
<b>1</b>	10	1/2 c	E
<b>2</b>	1	1/2 a	B
<b>3</b>	3	1/2 b	G
<b>4</b>	13	1/2 b	B

Verifica-se assim que todos os isolados de queijo “Serra da Estrela” com serovar 1/2c são idênticos entre si, apresentando 100% de similaridade entre si quando analisados por AFLP. Verifica-se que o grau de similaridade entre os isolados com serovares 1/2c e 1/2a é de 89% e que a semelhança entre os isolados 1/2c e 1/2 b é de 86%.

O isolado com serovar 1/2a apresenta um perfil diferente dos isolados com outros serovares, estando mais próximo dos isolados 1/2c (89% de similaridade entre 1/2a e 1/2c) do que dos isolados 1/2b (86% de similaridade entre 1/2a e 1/2b). Esta proximidade pode ser observada na figura 18, onde aparentemente se visualizam dois grandes grupos. No primeiro grupo estão reunidas as estirpes com serovares 1/2a e 1/2c, pertencentes à linhagem II e o segundo grupo compreende as estirpes de serovar 1/2b, pertencentes à linhagem I, a qual, segundo Liu (2006), compreende as estirpes de *L. monocytogenes* mais virulentas. Este agrupamento está de acordo com os resultados apresentados por Leite *et al.* (2006) que apresentavam o mesmo tipo de agrupamento, por serovares, ao nível das linhagens.

Três dos isolados com serovar 1/2b apresentam perfis diferentes dos restantes isolados com o mesmo serovar. Por análise das fotos dos géis verifica-se que estas estirpes apresentam apenas uma banda de diferença entre si. Esta diferença pode dever-se ao facto

desses três isolados serem provenientes de queijos recolhidos na exploração G, enquanto todos os outros isolados de serovar 1/2b provirem de queijos obtidos numa outra exploração (B) (tabela 11).

Savelkoul *et al.* (1999) consideram que estirpes que tenham entre 90 e 100% de semelhança entre si são consideradas idênticas e, como tal os dois tipos de estirpes de queijo com serovar 1/2b, com uma relação de similaridade de 93%, podem ser considerados idênticos entre si. Ainda, segundo os mesmos autores, estirpes com grau de similaridade entre 60 e 90% são consideradas diferentes mas pertencentes à mesma espécie. Pode assim considerar-se que as estirpes de *L.monocytogenes* com serovares 1/2a, 1/2b e 1/2c, são diferentes entre si.

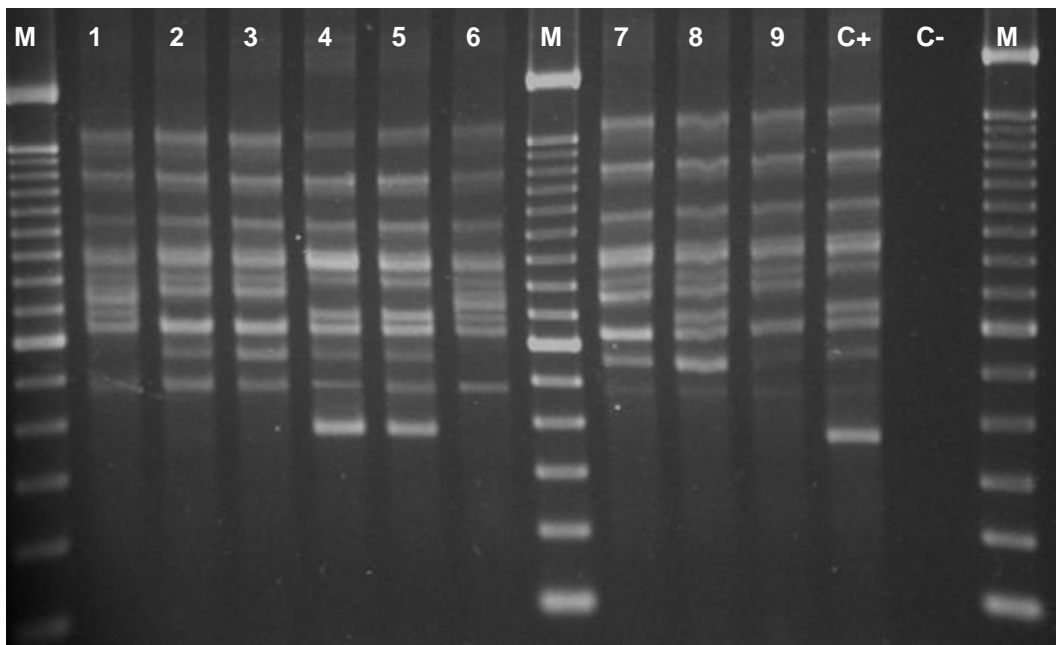
Os 27 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de queijo “Serra da Estrela”, utilizados neste trabalho, foram anteriormente caracterizados pelo método PFGE por Leite *et al.* (2006). Estes autores observaram a distribuição dos isolados de serovares 1/2a, 1/2b e 1/2c por três diferentes perfis PFGE. Assim, contrariamente ao que seria de supor, o método AFLP (4 tipos) mostrou neste estudo um maior poder discriminatório entre os isolados de *L. monocytogenes* do que a tipagem molecular por PFGE (3 tipos).

Num estudo realizado por Pintado (2005) foram analisados, pelo método AFLP, 24 isolados de *L. monocytogenes* com serovares 1/2, provenientes de queijo de ovelha de Castelo Branco. Destes, 23 isolados apresentavam serovar 1/2b e 1 pertencia ao serovar 1/2a. Os isolados 1/2b de queijo de Castelo Branco pertenciam a dois tipos AFLP diferentes: 19 foram classificados por Pintado, como tipo AFLP XV e 4 foram classificados como tipo AFLP IV-1. Através da comparação visual dos isolados 1/2b de Castelo Branco com os isolados analisados neste trabalho, verifica-se que os isolados classificados como tipo AFLP XV são idênticos aos 13 isolados de queijo “Serra da Estrela” com serovar 1/2b, provenientes da exploração B.

#### 4. Estirpes de *Listeria monocytogenes* de origem humana

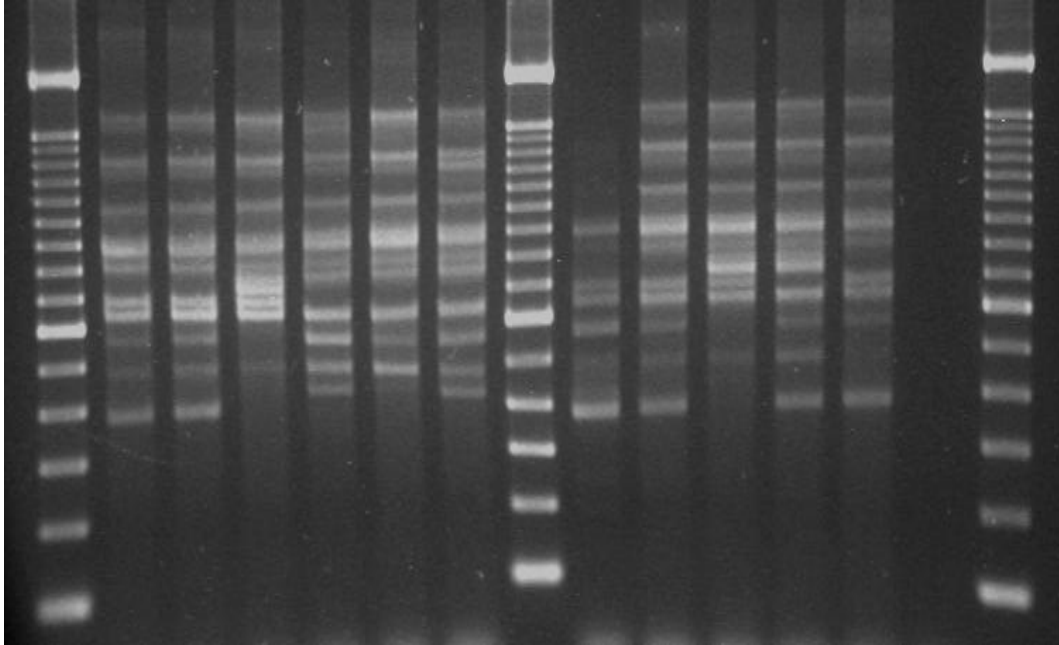
Os 28 isolados de *L. monocytogenes* de origem humana foram analisados pelo método AFLP, de acordo com o descrito no capítulo II (Materiais e métodos). Os perfis das estirpes de origem humana, obtidos pelo método AFLP, podem ser observados nas figuras 19, 20 e 21.

O número de bandas por perfil variou de 7 a 11, e o peso molecular das bandas variou, aproximadamente, entre 400 bp e 1500 bp.



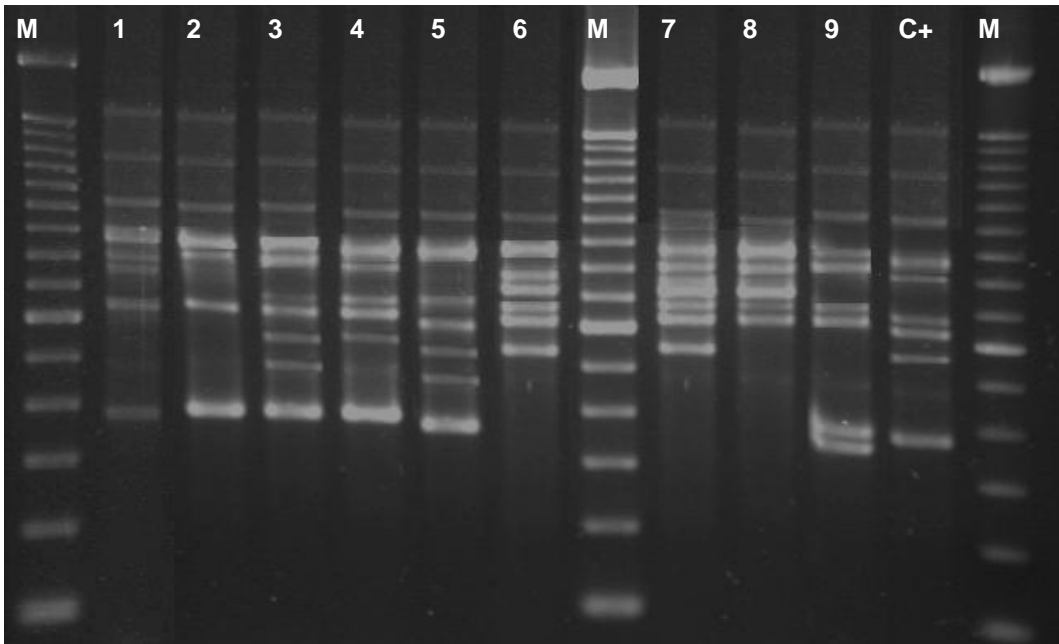
**Figura 19- Perfis AFLP dos isolados de *Listeria monocytogenes* de origem humana**

1- A-INSA\_L; 2 - B-INSA\_L; 3 - C-INSA\_L; 4 - ISA 3845; 5 - ISA 3846; 6 - ISA 3847; 7- ISA 3848; 8 - ISA 3849; 9- ISA 3850; C(+)- ISA 3001; C(-)- Controlo negativo; M- Marcador de 100bp.



**Figura 20- Perfis AFLP dos isolados de *Listeria monocytogenes* de origem humana**

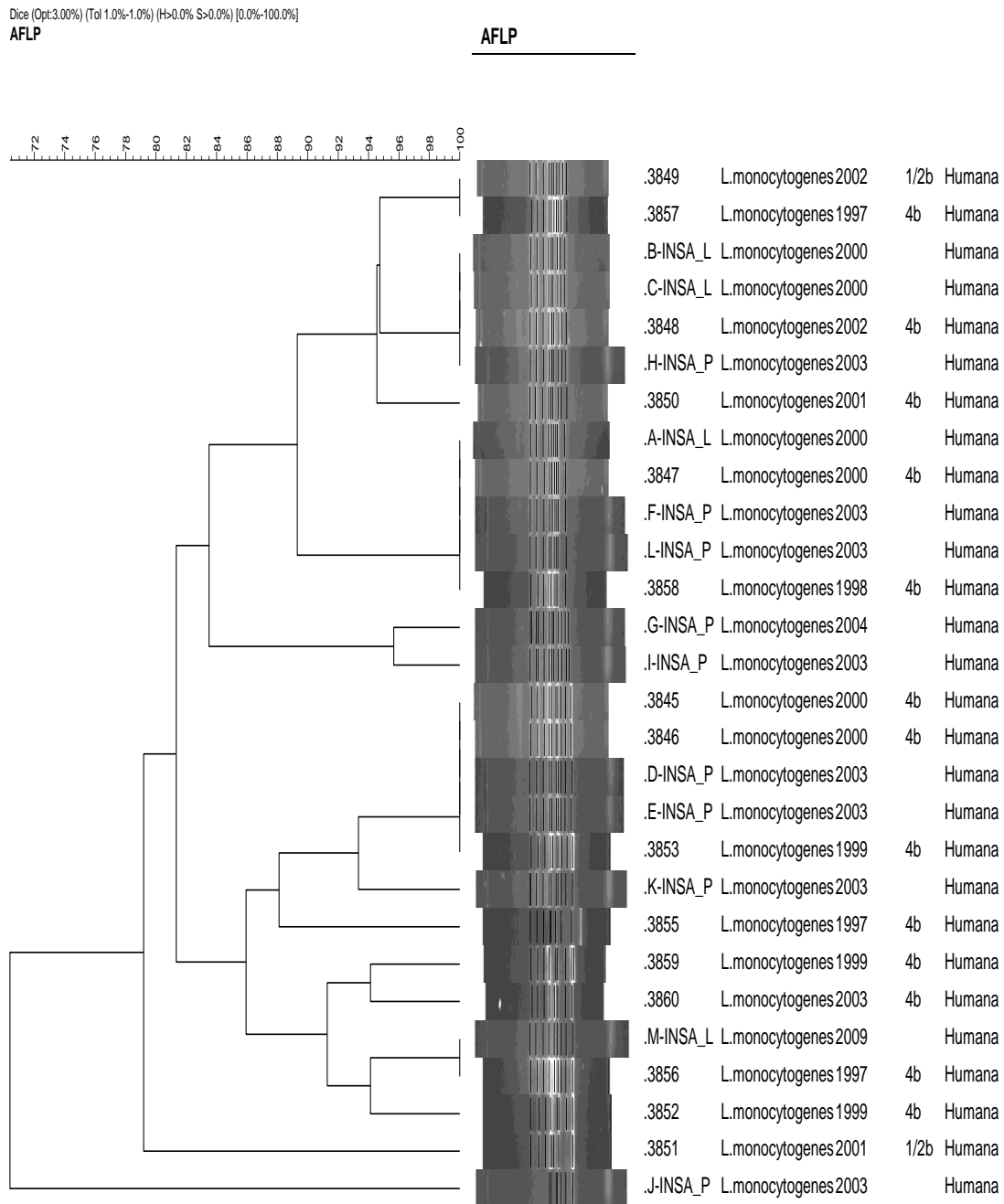
**1 – D-INSA\_P; 2 – E-INSA\_P; 3 – F-INSA\_P; 4 – G-INSA\_P; 5- H-INSA\_P; 6- I-INSA\_P ; 7- J-INSA\_P ; 8- K-INSA\_P ; 9- L-INSA\_P ; 10- M-INSA\_L; C(+)- ISA 3001; C(-)- Controlo negativo; M- Marcador de 100bp.**



**Figura 21- Perfis AFLP dos de *Listeria monocytogenes* de origem humana**

**1 –ISA 3851; 2 – ISA 3852; 3 – ISA 3853; 4 – ISA 3855; 5 – ISA 3856; 6- ISA 3857; 7- ISA 3858; 8- ISA 3859; 9- 3860; C(+)- ISA 3001; M- Marcador de 100bp.**

As fotos obtidas foram gravadas em formato *tiff*. e analisadas através do programa informático Bionumerics. O seguinte dendrograma mostra os 28 isolados de *L. monocytogenes* de origem humana e as relações existentes entre eles (figura 22).



**Figura 22 - Dendrograma resultante da análise por AFLP, dos isolados de *Listeria monocytogenes* de origem humana**

Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente de Dice.

Considera-se, pela análise da figura 22, que os isolados de *L. monocytogenes* de origem humana se agrupam em 15 *clusters*. Destes *clusters* 10 são constituídos por apenas uma estirpe e 5 reúnem estirpes com 100% de semelhança entre si. Os 15 *clusters* foram agrupados na seguinte tabela (tabela 12).

**Tabela 12- Relação entre os *clusters* de *L. monocytogenes*, obtidos por AFLP, e a região de origem dos isolados clínicos**

<b>Cluster obtido por AFLP</b>	<b>Nº de isolados por cluster</b>	<b>Serovar</b>	<b>Região de origem</b>	<b>Ano de isolamento</b>
1	2	1/2b (1)	Centro	2002
		4b (1)		1997
2	4	4b (1)	Centro (1)	2002
		ND (3)	Sul (2)	2000
			Norte (1)	2003
3	1	4b	Centro	2001
4	5	4b (2)	Centro (2)	1998 2000
		ND (3)	Norte (2)	2003
			Sul (1)	2000
5	1	ND	Norte	2004
6	1	ND	Norte	2003
7	5	4b (3)	Centro (3)	1999 2000 (2)
		ND (2)	Norte (2)	2003
8	1	ND	Norte	2003
9	1	4b	Centro	1997
10	1	4b	Centro	1999
11	1	4b	Centro	2003
12	2	4b (1)	Centro (1)	1997
		ND (1)	Sul (1)	2009
13	1	4b	Centro	1999
14	1	1/2b	Centro	2001
15	1	ND	Norte	2003

Legenda: ND – Não determinado; Entre parênteses está indicado o número de isolados por serovar, por região de origem ou ano de isolamento.

Os 28 isolados de *L. monocytogenes* de origem humana foram agrupados em 15 *clusters*, verificando-se assim uma diversidade genética razoável nos isolados de origem humana, mesmo nos identificados com o mesmo serovar. Por análise do dendrograma verifica-se que existem isolados idênticos entre si, com 100% de similaridade, e que a relação mais distante entre isolados apresenta uma semelhança de 70% (J-INSA\_P) com os restantes isolados.

Dentro dos isolados com serovar conhecido não se observa um particular agrupamento de isolados por serovar. Inclusive, o primeiro *cluster* agrupa dois isolados (ISA 3849 e ISA 3857) com serovares diferentes (1/2b e 4b).

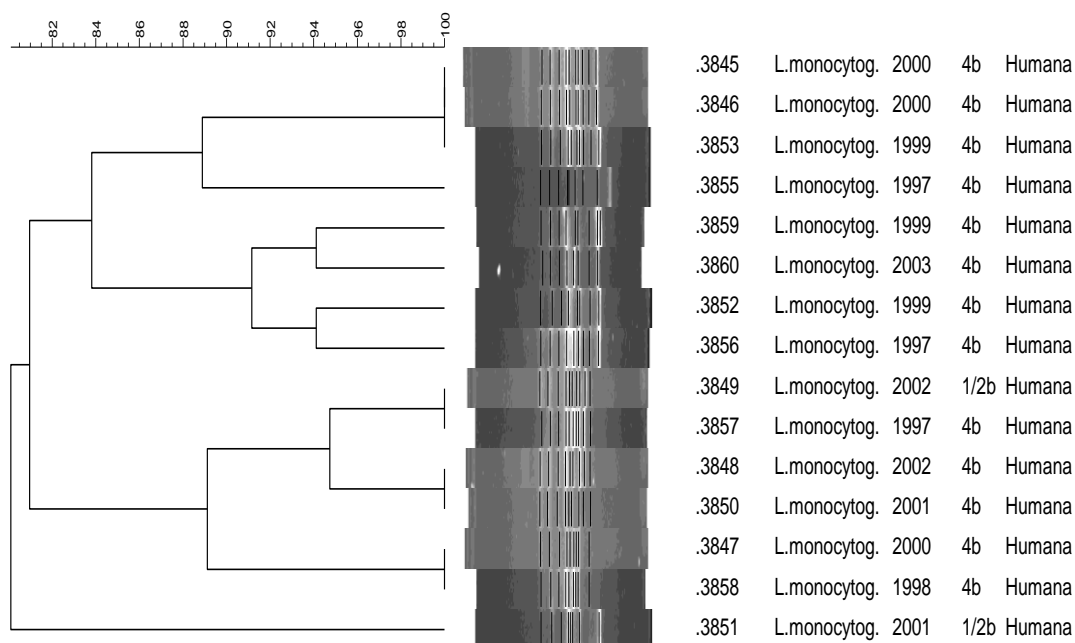
Verifica-se que todos os *clusters* contendo mais do que um isolado, à excepção do primeiro, englobam isolados provenientes de diferentes regiões do país. Assim, não se observa uma relação entre estirpes e regiões.

Pode também observar-se que, dentro dos vários *clusters*, os isolados se encontram dispersos pelo tempo. Cada *cluster*, com mais do que um isolado, reúne estirpes isoladas em vários anos. Curiosamente o cluster 12 agrupa duas estirpes isoladas com uma diferença de 12 anos entre si, uma em 1997 e outra em 2009. Não se observa assim relação entre isolados e datas de isolamento.

Dos 28 isolados de *L. monocytogenes* analisados neste trabalho por AFLP, 15 tinham já sido tipados por PFGE por Leite *et al.* (2006). Segundo estes autores, quando foi aplicado o método PFGE, não foi observada qualquer relação entre estirpes de origem humana. Para facilitar a comparação dos resultados obtidos por PFGE com AFLP, foi construído um dendrograma com os resultados obtidos por AFLP (figura 23).

Dice (Opt:3.00%) (Tol 1.0%-1.0%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]  
AFLP

AFLP



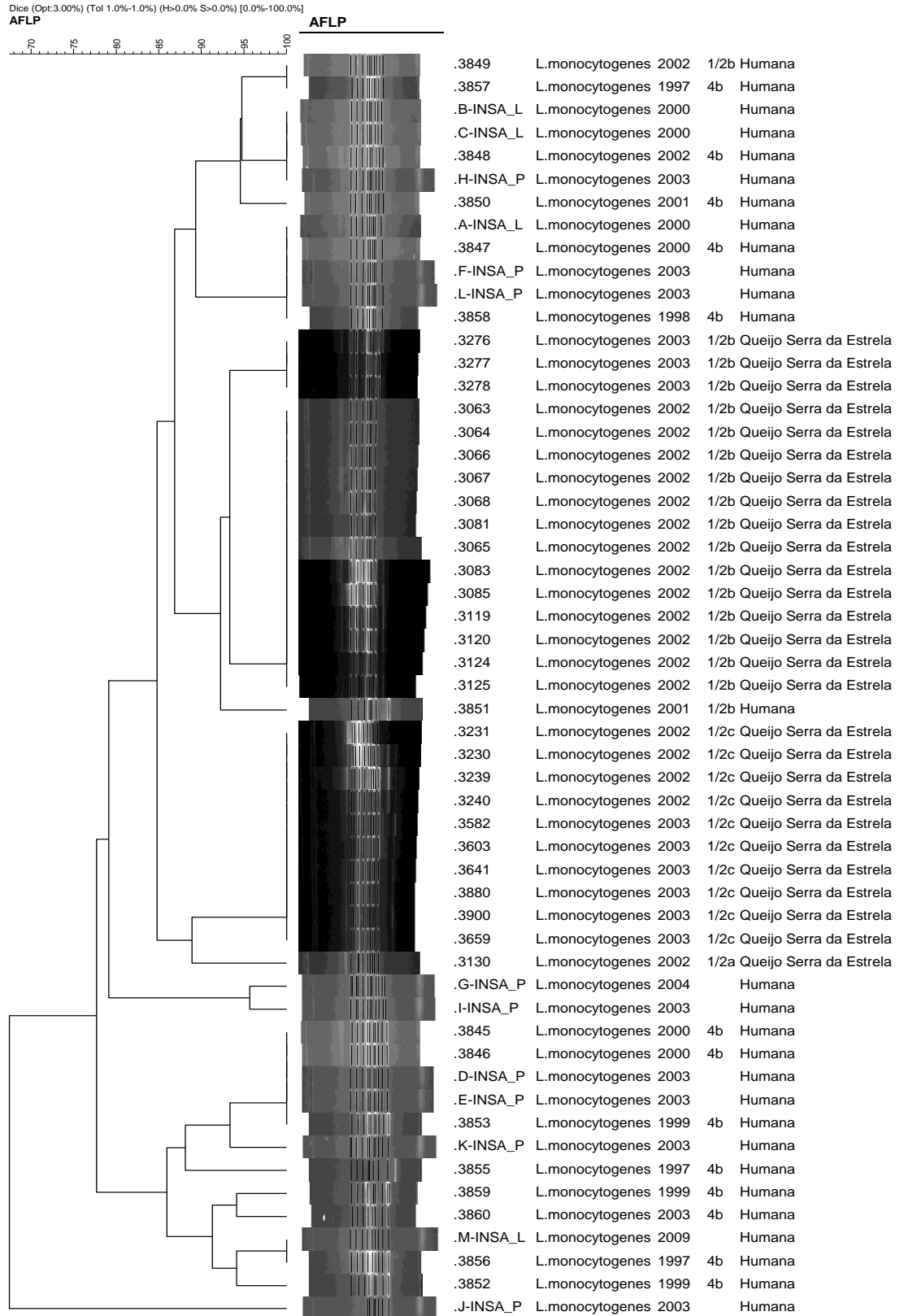
**Figura 23 – Dendrograma resultante da análise por AFLP, dos isolados de *Listeria monocytogenes* de origem humana (com tipo PFGE conhecido)**

Análise efectuada por Bionumerics. Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente de Dice.

Assim, quando é utilizado o método AFLP, observa-se o agrupamento dos isolados em 10 tipos diferentes. Neste caso, apesar da análise por AFLP se ter revelado ser um método discriminativo permitindo a diferenciação entre isolados (10 tipos), o método PFGE mostrou ser mais discriminativo, por ter diferenciado um maior número de isolados (15 tipos).

## 5. Relação entre isolados de origem humana e de queijos “Serra da Estrela”

Para averiguar eventuais relações entre isolados de *L. monocytogenes* de origem clínica e de queijo “Serra da Estrela”, os perfis obtidos por AFLP foram introduzidos no programa Bionumerics e foi construído um dendrograma que engloba a informação dos 55 isolados de origem clínica e alimentar (figura 24).



**Figura 24- Dendrograma mostrando a relação entre isolados de *Listeria monocytogenes* de queijo de ovelha “Serra da Estrela” e de origem humana, resultante da análise por AFLP Matriz de similaridade calculada por UPGMA com o coeficiente de Dice.**

Pela análise do dendrograma (figura 24), verifica-se a divisão dos isolados de *L. monocytogenes* de queijos e de origem humana em 19 clusters. Observa-se que não há perfis AFLP comuns entre estes isolados. O mesmo foi verificado por Leite *et al.* (2006) quando compararam *L. monocytogenes* de origem clínica com isolados de queijo.

A relação de semelhança mais próxima entre estirpes de queijo e de origem humana é de 92% e verifica-se entre uma estirpe de origem humana com o serovar 1/2b (ISA 3851) e os isolados de queijo “Serra da Estrela” com o mesmo serovar. Segue-se um grau de similaridade de 86% entre os isolados de queijo 1/2b e 4 dos clusters constituídos por isolados de origem humana (com serovares 1/2b, 4 b e outros não determinados).

A relação de similaridade mais próxima entre isolados de queijo com serovares 1/2a e 1/2c com estirpes de origem humana é de 84%, aproximadamente.

A relação de semelhança mais afastada entre isolados de queijo e de origem alimentar é de cerca de 68%, e é observada entre o isolado de origem humana J-INSA\_P e todos os restantes isolados.

## IV CONCLUSÃO

Actualmente, em Portugal não há vigilância para infecções por *L. monocytogenes* e, conseqüentemente, não existem muitos estudos acerca da listeriose e da sua relação com alimentos. Por este motivo, pretendeu-se com este trabalho caracterizar a diversidade genotípica de estirpes de *L. monocytogenes* isoladas a partir de casos de listeriose humana, cedidas por hospitais de 3 regiões do país, e observar a sua distribuição no espaço e no tempo.

Paralelamente, pretendeu-se averiguar possíveis relações de similaridade entre estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de casos de listeriose, recolhidas em hospitais de 3 regiões do país, e estirpes de *L. monocytogenes* queijo de ovelha “Serra da Estrela”. A escolha deste tipo de alimento, para apurar eventuais relações com casos clínicos de listeriose humana, deveu-se ao facto de ser um produto distribuído e consumido em todo o território nacional e possuir características que permitem o crescimento de *L. monocytogenes*, tais como, entre outras, ser armazenado a temperaturas de refrigeração, ser um produto laborado a partir de leite cru e não sofrer qualquer tratamento térmico que permita a erradicação deste microrganismo.

Para caracterizar genotipicamente estirpes de *L. monocytogenes* provenientes de casos de listeriose humana e de queijo “Serra da Estrela” foi implementado o método de tipagem molecular AFLP. Este método foi escolhido devido à sua reconhecida reprodutibilidade, poder discriminatório e por ser um método relativamente rápido, permitindo a obtenção de uma resposta ao fim de 24 h. Estudos anteriores demonstraram que é um método reprodutível e com boa capacidade para diferenciar estirpes (Olive e Bean, 1999). O uso de métodos de tipagem molecular ou genotípicos rápidos, reprodutíveis e discriminatórios são importantes na condução da vigilância epidemiológica e detecção de surtos de listeriose humana (Sauders *et al.*, 2003).

Confirmou-se a reprodutibilidade interna e entre diferentes laboratórios. A reprodutibilidade foi confirmada testando 10 estirpes de *L. monocytogenes* de perfil AFLP conhecido.

Os 27 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de queijo “Serra da Estrela”, pertencentes a 3 serovares diferentes (1/2a, 1/2b e 1/2c) foram agrupadas em 4 tipos AFLP diferentes. Foram identificadas estirpes, com serovares 1/2b, distintas em explorações distintas. O agrupamento de um grande número de isolados em *clusters* pode indicar que estes sejam os mais comuns e recorrentes nas explorações onde são encontrados.

Algumas das 28 estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de casos de listeriose humana são idênticas entre si, tendo sido observados 15 tipos AFLP diferentes. Os clusters contendo mais do que um isolado, são constituídos por estirpes provenientes de regiões diferentes, isoladas em diferentes anos. Pode-se assim, pôr a hipótese de que existem estirpes mais comuns e recorrentes distribuídas pelo território nacional, que podem eventualmente ter origem no mesmo tipo de alimento. Veja-se, por exemplo, o caso de uma estirpe de *L. monocytogenes* isolada na região centro em 1997, que é idêntica a uma estirpe isolada no sul do país em 2009. Isto vem comprovar a teoria de Souders *et al.* (2003), de que alguns surtos de listeriose têm sido representados como *clusters* geográficos associados com o consumo localizado de um alimento contaminado, enquanto outros focos incluem casos dispersos territorialmente, causados por uma ampla distribuição de alimentos contaminados.

Não há qualquer associação entre os isolados de *L. monocytogenes* de origem humana e os isolados provenientes de queijo da “Serra da Estrela” estudados. Podendo-se colocar a hipótese de que os isolados de queijo estudados não estiveram envolvidos nos casos de listeriose em questão. No entanto, neste estudo foram analisados apenas isolados de queijo “Serra da Estrela” com serovares 1/2, que fazem parte de um conjunto de isolados obtidos no âmbito de um projecto que inclui também isolados de *L. monocytogenes* de serovar 4b, como tal será importante comparar no futuro os isolados clínicos com os isolados provenientes de queijo de serovar 4b.

Relativamente aos isolados de queijo “Serra da Estrela” foram identificados neste trabalho 4 tipos AFLP e apenas 3 tipos PFGE foram identificados por Leite *et al.* (2006), quando analisado os mesmos isolados. Tal vem contrariar diversos autores, que consideram o método PFGE mais discriminativo que o AFLP. No entanto, por comparação de 15 das estirpes de origem humana, foram identificados 15 tipos PFGE e 10 tipos AFLP, o que vai de encontro ao descrito na bibliografia.

Dezanove isolados de *L. monocytogenes*, com serovares 1/2b, provenientes de queijo de ovelha de Castelo Branco, analisados por AFLP por Pintado (2005), são idênticos a 13 isolados, com serovar 1/2b, oriundos de queijo “Serra da Estrela”. Assim, parece que a mesma estirpe se encontra disseminada nas regiões de Castelo Branco e Serra da Estrela, o que pode ser explicado pela proximidade das regiões entre si.

A listeriose não é uma doença de declaração obrigatória em Portugal, por isso é desconhecida a incidência desta doença no nosso país. Pode-se concluir que o microrganismo *L. monocytogenes* se encontra disperso por várias regiões do país, mas não há uma associação desta doença com os alimentos que a provocam. Para que se possa ter

conhecimento da ocorrência de casos ou surtos de listeriose e poder levar-se a cabo a investigação dos alimentos associados, é essencial que sejam implementados sistemas oficiais de vigilância eficazes. Existem expectativas de que a recente criação do sistema nacional de informação de vigilância epidemiológica, denominado SINAVE (Anónimo, 2009), venha alterar esta situação. Além disto, é imprescindível alertar o pessoal médico para a problemática da listeriose, pois os casos de listeriose são muitas vezes mascarados com sintomas gripais, principalmente no caso de grávidas.

Relativamente aos queijos, é importante alertar o produtor para a problemática da presença de *Listeria* em queijos e as consequências que daí provêm quer a nível de saúde pública quer a nível económico. É muito útil a formação e apoio técnico ao produtor, na identificação dos pontos críticos de controlo, implementação de boas práticas de fabrico, tendo especial atenção à limpeza e desinfeção de instalações e equipamentos, tudo isto com o objectivo de minimizar a contaminação de queijos com *L. monocytogenes*.

## V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**Anónimo** (2009). Lei nº 81/2009 de 21 de Agosto. *Diário da República*, 1ª série, nº 162.

**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. *International Journal of Food Microbiology*, 49: 95–102.

**Allen, K.; Sopwith, W.; Regan, M.** (2005). Searching for Sources: Increased Listeriosis in the North West. *Health Protection Articles*, Out-Dec 2005, 9-10.

**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.

**Autio, T.; Keto-Timonen, R.; Lundén, J.; Bjorkroth, J.; Korkeala, H.** (2003). Characterisation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Systematic and Applied Microbiology*, 26: 539-545.

**Autio, T.** (2003). Tracing the sources of *Listeria monocytogenes* contamination and listeriosis using molecular tools. Academic dissertation . Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki Finland.

Disponível em:

<http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/ela/elint/vk/autio/tracingt.pdf>. Acedido em Outubro de 2009.

**Bania, J.; Żarczyńska, A.; Molenda, J. ; Dąbrowska, A. ; Kosek-Paszkowska, K.; Więckowska-Szakiel, M.; Różalska, B.** (2009). Subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates by actA gene sequencing, PCR-Fingerprinting, and Cell-Invasion Assay. *Folia Microbiology*, 54: 17–24.

**Borucki, M.K.; Call, D.R.** (2003). *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 5537–5540.

**Brito, L.; Madanelo, J.; Lima, M. S.** (2004). Queijo Serra da Estrela - Cartilha de Boas Práticas; da Quinta ao Prato. Instituto Superior de Agronomia, Ancose, 45 pp.

**Brosch, R.; Chen, J.; Luchansky, J.B.** (1994). Pulsed-field fingerprinting of *listeriae*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2584–2592.

**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.; Knabel, S.J.** (2008). Strain Typing. In Liu, D. (ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press, 7: 203-240.

**Corcoran, D.; Clancy, D.; O'Mahony M.; Grant K.; Hyland E.; Shanaghy N.; Whyte P.; McLaughlin J.; Moloney A.; Fanning S.** (2006) Comparison of *Listeria monocytogenes* strain types in Irish smoked salmon and other foods. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 209: 527-34.

**Crum, N.F.** (2002). Update on *Listeria monocytogenes* infection. *Current Gastroenterology Reports*, 4: 287–296.

**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: 705–711.

**Farber, J.M.** (1996). An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, 59: 1091-1101.

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

**Farber, J.M.; Peterkin, P.I.** (2000). *Listeria monocytogenes*. In Lund, B.; Baird-Parker, T.; Gould, G., *The Microbiological Safety and Quality of Food*. An Aspen Publication. Volume II (cap. 44), p. 1178-1216.

**Gandhi, M.; Chikindas, M.L.** (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1–15.

**Gautom R.K.** (1997). Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology*, 35: 2977–2980.

**Gibson, J. R.; Slater, E.; Xerry, J.; Tompkins, D.S.; Owen, R.J.** (1998). Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36: 2580–2585.

**Graves, L.M.; Swaminathan, B.; Reeves, M.W.; Hunter, S.B.; Weaver, R.E.; Plikaytis, B.D.; Schuchat, A.** (1994). Comparison of ribotyping and multilocus enzyme electrophoresis for subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 32: 2936–2943.

**Guerra, M.M.; Bernardo, F.A.** (2004). O risco da listeriose e a identificação do perigo – Revisão. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 99: 69-76.

**Guerra, M.M.; Bernardo, F.; McLauchlin, J.** (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 456–461.

**Guerra, M.M.; McLauchlin, J.; Bernardo, F.A.** (2001). *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. *Food Microbiology*, 18: 423-429.

**Herman, L.** (1997). Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*, 14: 103–110.

**ILSI** (2005). International Life Sciences Institute Research Foundation / Risk Science Institute, 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: 1932-1994.

**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.

**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.

**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. *International Journal of Food Microbiology*, 106: 111–121.

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

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

**Lund, B.M.; Baird-Parker, T.C.; Gould, G.W.** (2000). The microbiological safety and quality of food. Springer, 1: 1184.

**Macedo, A.C.; Malcata, F.X.; Oliveira, J.C.** (1993). The technology, chemistry and microbiology of Serra cheese: a review. *Journal Dairy Science*.76: 1725–1739.

**McLauchlin, J.** (1996). The relationship between *Listeria* and Listeriosis. *Food Control*, 7: 187-193.

**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.

**McLauchlin, J.; Ripabelli, G.; Brett, M.M.; Threlfall, E.J. (2000).** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 21–28.

**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.

**Neves, E.; Lourenço, A.; Silva, A.C.; Coutinho, R.; Brito, L. (2008).** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from different sources and geographical origins and representative of the twelve serovars. *Systematic and Applied Microbiology*, 31: 387–392.

**Olivares, R. (2009).** *Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. *Medwave*, Ano IX (6). Descarregado de [www.mednet.cl](http://www.mednet.cl) em Novembro de 2009.

**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.

**Parisi, A.; Latorre, L.; Normanno, G.; Miccolupo, A.; Fracalvieri, R.; Lorusso, V.; Santagada, G. (2009).** Amplified fragment length polymorphism and multilocus sequence typing for high resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiology*, doi: 10.1016/j.fm.2009.09.001.

**Pintado, C.M.B.S. (2005).** Application of molecular subtyping for characterizing *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products and environment. Health Protection Agency, London.

**Pintado, C.M.B.S. (2009).** Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de ovelha. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

**Pintado, C.M.B.S.; Grant, K.A.; Halford-Maw, R; Hampton, M.D.; Ferreira, M.A.S.S.; McLauchlin, J.** (2008). 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. doi:10.1089/fpd.2008.0246.

**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.

**Rocourt, J.; Jacquet, C.; Reilly, A.** (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 197-209.

**Sauders, B.D.; Fortes, E.D.; Morse, D.L.; Dumas, N.; Kiehlbauch, J.A.; Schukken, Y.; Hibbs, J.R.; Wiedmann, M.** (2003). Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. *Emerging Infectious Diseases*, 9: 672-680.

**Savelkoul, P.H.M.; Aarts, H. J. M.; 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 Art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3083-3091.

**Seeliger, H.P.R.; Hohne, K.** (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan, T.; Norris, J.R.. *Methods in Microbiology*. Academic Press, London, 31–49.

**Seeliger, H.P.R. ; Jones, D.** (1987). *Listeria*. In: Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M.; Holt, J.. *Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, 1235–1245.

**Somer, L.; Danin-Poleg, Y.; Diamant, E.; Gur-Arie, R.; Palti, Y.; Kashi, Y.** (2005). Amplified intergenic locus polymorphism as a basis for bacterial typing of *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3144-3152.

**de Valk, H.; Jacquet, C.; Goulet, V.; Vaillant, V.; Perra, A.; Desenclos, J.C.; Martin, P. & the Listeria Working Group** (2003). Feasibility study for a collaborative

surveillance of *Listeria* infections in Europe. Report to the European Commission, DG SANCO, Paris.

**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: 584-640.

**Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Zabeau, M.** (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–4414.

**Wagner, M; Eliskases-Lechner, F.; Rieck, P.; Hein, I.; Allerberger, F.** (2006). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. *Journal of Food Protection*, 69: 1297-1303.

**Warriner, K.; Namvar, A.** (2009). What is the hysteria with *Listeria*? *Food Science and Technology*, 20: 245-254.