

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

**DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* POR PCR EM TEMPO REAL E  
AVALIAÇÃO DA SUA CITOPATOGENICIDADE**

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Qualidade  
em Análises com Especialização em Análises Clínicas**

ANDREIA LÚCIA GONÇALVES ADRIÃO

FARO 2007

*Aos meus pais.*

Nome: Andreia Lúcia Gonçalves Adrião

Departamento: Química e Bioquímica – Faculdade de Ciências e Tecnologia

Orientadora: Maria Leonor Faleiro

Data: Dezembro 2007

Título da Dissertação: Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes* por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

### **Júri:**

Presidente: **Doutora Maria da Conceição Domingues Amado Mateus**, Professora Auxiliar do Departamento de Química, Bioquímica e Farmácia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade do Algarve

**Doutora Maria Adélia da Silva Santos Ferreira**, Professora Auxiliar do Departamento de Botânica e Engenharia Biológica do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

**Doutora Lídia Adelina Pó Catalão Dionísio**, Professora Auxiliar da Área Departamental de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais da Universidade do Algarve

**Doutora Maria Leonor Faleiro**, Professora Auxiliar da Área Departamental de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia e Recursos Naturais da Universidade do Algarve

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à pessoa que permitiu que este trabalho fosse realizado, a minha orientadora Maria Leonor Faleiro.

Gostaria de prestar o meu agradecimento a todos aqueles que ao me fornecerem material científico permitiram que o trabalho progredisse, Teresa Destro da Universidade de São Paulo, Brasil; Christine Jacquet “Centre National de Référence dès Listeria”, Instituto Pasteur, França; William Tom, “Swedish University of Agricultural Sciences”, Suécia; ao Instituto Gulbenkian Ciência e Michael Schmid, “Technische Universitat Munchen”, Munique.

Quero agradecer igualmente ao projecto LMTOOCHE QLK1-CT-2002-02219 que financiou o presente estudo.

Não poderia esquecer as minhas colegas de laboratório que tanto me auxiliaram, Liseta, Elsa, Daniela, Vanessa, Ângela, Teresa e Lena. Assim como à Márcia Valente e Marta Valente que foram incansáveis e mostraram que a amizade e o trabalho caminham de mãos dadas, um grande obrigado às duas.

E para terminar em grande, um grande obrigada aos meus pais por serem como são e por sempre me apoiarem nas minhas decisões. Aos meus irmãos que estiveram sempre comigo e a ti Silvério pelas vezes em que não havia vento e com o teu sopro o meu barco andou.

## RESUMO

A listeriose é uma doença associada ao consumo de alimentos contaminados com a bactéria *Listeria monocytogenes*, embora se possam verificar outras vias de transmissão. A taxa de mortalidade desta doença de origem alimentar é relativamente elevada, particularmente nos indivíduos com o sistema imunitário debilitado, idosos, jovens e grávidas. Entre outros factores de virulência da bactéria *Listeria monocytogenes* encontra-se a proteína associada à invasão, conhecida como Iap. São conhecidos três genótipos dentro da espécie *Listeria monocytogenes*, quer através de genotipagem, quer através da análise dos genes *iap*, *plcA* e *PlcB*. A importância destes genótipos entre isolados de origem alimentar é ainda desconhecida.

Com o objectivo de estabelecer a distribuição destes genótipos entre estirpes isoladas de ambientes de processamento artesanal de queijo, bem como a sua citopatogenicidade, estabeleceu-se o presente estudo. Determinou-se o genótipo de um grupo de estirpes de *L. monocytogenes* e com base neste resultado relacionou-se a capacidade de invasão em células NIH3T3 de cada genótipo. Implementou-se posteriormente a determinação dos diferentes genótipos através da técnica de PCR em tempo real.

Observou-se, porém que a capacidade de invasão de *L. monocytogenes* em células NIH3T3 não depende do genótipo, tendo sido observado capacidades invasivas significativamente iguais para os três genótipos. Contudo, as reacções de detecção dos diferentes genótipos por PCR em tempo real foram bem sucedidas, sendo específicas para cada genótipo tal como demonstrando sensibilidade e linearidade dentro da gama de concentrações testada,  $r^2 = 0,97$  para a reacção de detecção de genótipo I,  $r^2 = 0,99$  para genótipo II e  $r^2 = 0,98$  para o genótipo III.

Palavras chave

*Listeria monocytogenes*/ PCR em tempo real/ Controlo de Qualidade/  
citopatogenicidade/ NIH3T3/ genotipagem

## **ABSTRACT**

Listeriosis is a sickness associated to ingestion of *Listeria monocytogenes* contaminated food, otherwise there are other ways of transmission. This sickness shows a high mortality tax, particularly on immunocompromised individuals, elderly, young people and pregnant women. Beside other *Listeria monocytogenes* virulence factors, there is the invasion associated protein. With genotyping analysis as well as analysis of *iap*, *plcA* and *PlcB* genes, there are known three genotypes among the specie *Listeria monocytogenes*. The significance of these genotypes among food isolates is still unknown.

This study was established with the aim to set up a distribution of these genotypes on strains isolated from environment of cheese manufacture, as well as their citopatogenicity. The genotype of a group of *L. monocytogenes* strains was achieved and the invasion capacity on NIH3T3 cells was related with each genotype. Afterwards it was determined the different genotypes using the Real time PCR technique.

It was observed that the invasion ability of *L. monocytogenes* on NIH3T3 cells isn't genotype dependent, as similar invasion capacities were observed for all the genotypes. Otherwise, real time PCR detection reactions of the different genotypes were well succeed, being specifics for each genotype and showing sensibility and linearity among the tested concentrations,  $r^2 = 0,97$  for genotype I detection reaction,  $r^2 = 0,99$  for genotype II and  $r^2 = 0,98$  for genotype III.

Keywords:

*Listeria monocytogenes*/ Real time PCR/ Quality control/ citopatogenicity/



---

# ÍNDICE

1 – Introdução -----	
1.1 – Características gerais do género <i>Listeria</i> -----	
1.2 – Descrição e aspectos taxonómicos da bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 4
1.2.1 – Mecanismos de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 5
1.2.2 – Mecanismo de invasão celular -----	pág. 6
1.2.3 – Factores de virulência -----	pág. 10
1.2.3.1 – A proteína associada à invasão ( <i>Iap</i> ) -----	pág. 11
1.3 – A doença listeriose-----	pág. 13
1.4 – Contaminação dos alimentos por <i>Listeria monocytogenes</i> e implicações para a saúde pública -----	pág. 14
1.5 – Métodos de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 16
1.5.1 – Técnica de <i>Polymerase Chain Reaction</i> , PCR-----	pág. 17
1.5.1.1 – Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR-----	pág. 18
1.5.2 – A técnica de PCR em tempo real-----	pág. 20
1.5.2.1 – Fluoróforos - SYBR® Green-----	pág. 23
1.5.2.2 – Técnica de PCR em tempo real na detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 24
1.6 – Controlo e garantia de qualidade da técnica PCR-----	pág. 25
1.7 – Objectivos-----	pág. 28
2- Material e Métodos-----	pág. 29
2.1 – Material-----	pág. 29
2.1.1 – Estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 29
2.1.2 – <i>Primers</i> -----	pág. 32

---

2.1.2.1 – <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR -----	pág. 32
2.1.2.2 – <i>Primers</i> utilizados na técnica de PCR em tempo real -----	pág. 33
2.1.3 – Invasão celular -----	pág. 35
2.2 – Métodos -----	pág. 36
2.2.1 – Extracção de ADN pelo método Guanidina, EDTA e Sarcosil (G.E.S) ----	pág. 36
2.2.2 – Amplificação do ADN por reacção em cadeia de polimerase (PCR) -----	pág. 37
2.2.3 – Electroforese em gel de agarose -----	pág. 38
2.2.4 – Ensaio de invasão celular de células NIH3T3 pela bactéria <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 40
2.2.5 – Reacção de PCR em tempo real para detectar os diferentes genótipos de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 41
2.2.5.1 – Linearidade, sensibilidade e gama de concentrações das reacções de detecção dos genótipos através da técnica de PCR em tempo real -----	pág. 43
3 – Resultados -----	pág. 44
3.1 – Determinação do genótipo de <i>Listeria monocytogenes</i> -----	pág. 44
3.2 – Ensaio de invasão celular de <i>Listeria monocytogenes</i> em células NIH3T3 -	pág. 48
3.3 – Detecção dos diversos genótipos através da técnica de PCR em tempo real--	pág.53
3.3.1 – Reacção de detecção de estirpes <i>Listeria monocytogenes</i> referentes ao genótipo I -----	pág.54
3.3.2 – Reacção de detecção de estirpes <i>Listeria monocytogenes</i> referentes ao genótipo II-----	pág. 57
3.3.3 – Reacção de detecção de estirpes <i>Listeria monocytogenes</i> referentes ao genótipo III -----	pág. 59

---

3.4 – Parâmetros das reacções de detecção dos diferentes genótipos através da técnica de PCR em tempo real -----	pág. 61
3.4.1 – Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> pertencentes ao genótipo I -----	pág. 61
3.4.2 – Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> pertencentes ao genótipo II -----	pág. 62
3.4.3 – Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i> pertencentes ao genótipo III -----	pág. 68
4 – Discussão -----	pág. 71
4.1 – Determinação do genótipo de <i>Listeria monoytogenes</i> -----	pág. 71
4.2 – Ensaio de invasão celular de <i>Listeria monocytogenes</i> em células NIH3T3--	pág. 72
4.3 – Detecção dos diversos genótipos através da técnica de PCR em tempo real-	pág.74
4.4 – Considerações finais -----	pág. 80
5 – Bibliografia-----	pág.81
Anexos-----	pág.98

# 1- INTRODUÇÃO

## 1.1– Características gerais do género *Listeria*

As bactérias pertencentes ao género *Listeria* encontram-se amplamente distribuídas na natureza. São bastonetes microaerofílicos que reagem positivamente à coloração de *Gram* e agrupam-se formando paliçada (Picchi *et al.*, 1999).

No ano de 1926, Murray e os seus colaboradores apontaram pela primeira vez o género *Listeria*. Este foi descrito como o agente etiológico de doenças entre cobaias de laboratório e coelhos do Departamento de Patologia da Universidade de Cambridge. Foi proposto o nome de *Bacterium monocytogenes* para a nova bactéria pelo facto de se observar um valor elevado de leucócitos mononucleares no sangue.

O nome do género foi escolhido em homenagem ao cirurgião Lord Lister, sendo que em 1940 foi modificado para *Listeria*. Até à década de 1970, a existência de *Listeria* permaneceu um pouco obscura. Não houve qualquer referência à bactéria nas três primeiras edições do Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey, publicadas respectivamente em 1923, 1925 e 1930. Na edição de 1934 foi inserida na família *Corynebacteriaceae* (Rocourt, 1999). Já na oitava edição deste manual, a bactéria *Listeria* foi considerada um género com afiliação incerta e classificada juntamente com *Erysipelothrix* e *Cayophanon*, e em seguida na família *Lactobacillaceae* (Lovett, 1989; Rocourt, 1999). Por fim, em 1986, no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey, a bactéria *Listeria* foi classificada na secção dos bacilos gram-positivos, regulares e não esporulados, juntamente com os géneros *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* e *Cayophanon* (Seelinger e Jones, 1986; Holt *et al.*, 1994; Rocourt, 1999).

Têm sido utilizados diversos marcadores quimiotaxonômicos na verificação da posição filogenética do género *Listeria*. Esta pertence ao grupo de bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo de G/C no ADN (< 55%), o que reforça a sua distinção do género *Corynebacterium spp.*, assim como a sua relação com bactérias lácticas (Rocourt, 1999).

Análises filogenéticas e métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do género *Listeria*, foram assim analisados os valores de homologia de ADN, sequência do 16S ARN, propriedades quimiotaxonômicas e análise do enzima multilocus. A partir destes resultados, no género *Listeria* que apenas continha a espécie *Listeria monocytogenes*, foram incluídas as espécies *Listeria denitrificans*, em 1984, *Listeria grayi*, em 1966, *Listeria murrayi*, em 1971, *Listeria innocua*, em 1981, *Listeria welshimeri* e *Listeria seeligeri* em 1983 e *Listeria ivanovii*, em 1985 (Rocourt, 1999).

Das espécies existentes dentro do género *Listeria* apenas a *Listeria grayi* não foi detectada em alimentos e no ambiente (Jay, 1996; McLauchlin, 1997).

As espécies *L. ivanovii* e *L. seeligeri* foram associadas a quatro casos de listeriose humana. A espécie *L. seeligeri* é frequentemente considerada como não patogénica (Klima e Montville, 1995). A única espécie consistentemente patogénica para o Homem é a *L. monocytogenes*, dentro da qual existem 13 serótipos causadores de doença (Picchi *et al.*, 1999).

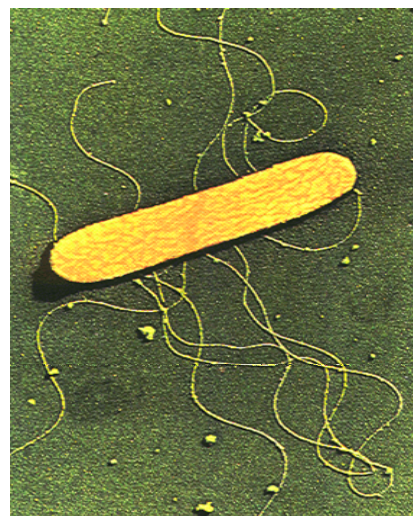
Através de estudos enzimáticos foram reconhecidos dois grupos de subespécies entre as estirpes da espécie *L. ivanovii*, foram estes a *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis* (Boerlin *et al.*, 1992). As duas subespécies são diferenciadas pela capacidade de produzir ácido a partir da ribose (subsp. *ivanovii*) e N-acetil-β-D-manosamina (subsp. *londoniensis*). Estudos semelhantes realizados por

Rasmussen *et al.*, (1991), indicaram a presença de dois grupos de duas possíveis subespécies dentro da espécie *L. monocytogenes* (Boerlin *et al.*, 1991). A comparação de sequências de ADN de modo a elaborar uma classificação sugere que esta pode ser mais complexa do que anteriormente previsto. A comparação dos genes que codificam flegelina (*flaA*), a proteína associada à invasão (*iap*), listeriolisina O (*hly*) e 23S rRNA, indicam que as estirpes de *L. monocytogenes* podem ser divididas em três grupos distintos de sequências (Rasmussen *et al.*, 1995). A subdivisão de *L. monocytogenes* com base na sequência de ADN é bem correlacionada com o serótipo, tal como os resultados obtidos pela análise em electroforese em gel e pela análise com enzimas multilocus. Porém, classificações recentes que utilizam a sequência de ADN não permitiram ainda obter uma reclassificação formal, pois as novas subdivisões requerem confirmação através de testes tradicionais.

Através da comparação da sequência genética do gene *iap* observou-se que as estirpes de *L. monocytogenes* se agrupavam em três genótipos distintos. As estirpes referentes aos serótipos b e d pertenciam ao genótipo I, serótipos a e c ao genótipo II e aos serótipos 4a e 4c correspondia o genótipo III. Foram assim classificados em genótipos *iap* visto a análise ter sido elaborada na sequência de bases pertencentes ao gene com o mesmo nome. Esta evidência filogenética somente pode ser obtida se se tiver apenas em conta as zonas de sequência não repetitiva do gene *iap* (Schmid *et al.*, 2003).

## 1.2 - Descrição e aspectos taxonômicos da bactéria *L. monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* consiste num bacilo Gram-positivo, com dimensões de 0,4  $\mu\text{m}$  – 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro e 0,5  $\mu\text{m}$  – 2  $\mu\text{m}$  de comprimento (figura 1). Apresenta extremidades arredondadas e pode ser observado isolado ou em cadeias curtas em forma cocóide ou filamentosa quando em culturas com 2 - 3 dias (Farber e Peterkin, 1991; Lovett, 1989). Quando se encontra em culturas envelhecidas, assemelha-se a cocos e perde a habilidade de reter os corantes utilizados na coloração de *Gram*, o que leva frequentemente a erros de identificação (Seeliger e Jones, 1986).



**Figura 1** – Imagem de *L. monocytogenes*.

Adaptado de

<http://mediatheek.thinkquest.nl>

Conseqüentemente, os membros do género *Listeria* têm sido algumas vezes classificados como *Corynebacterium* spp., *Haemophilus influenza*, *Erysipelothrix* spp, pneumococos, estreptococos ou estafilococos (Ryser e Marth, 1991; Donnelly, 2001).

Esta bactéria é desprovida de cápsula, não esporulada (Loguercio *et al.*, 2001), pode crescer em aerobiose ou anaerobiose, mas prefere ambientes microaerofílicos (Rocourt, 1999). Apresenta uma rápida multiplicação na maioria dos meios bacteriológicos tradicionais, crescendo bem em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI), caldo soja tripticase e caldo tripticase (Jay, 1996). Requer biotina, riboflavina, tiamina e aminoácidos como cisteína, glutamina, isoleucina e valina. Em agar nutritivo, as colónias características de *Listeria* adquirem uma coloração cinza azul, apresentado um diâmetro de 0,2 a 0,8 mm após 24 horas de incubação (Donnelly, 2001). Quando visualizadas sob luz transmitida em

direcção oblíqua (sistema de iluminação de Henry), as colónias apresentam brilho azul esverdeado (Jay, 1996; Rocourt, 1999).

Relativamente ao limite de temperatura de crescimento a bactéria *L. monocytogenes* é considerada como psicotrófica cuja multiplicação ocorre a temperaturas que variam entre -0,4 °C a 50 °C, com crescimento óptimo entre 30 a 37 °C (Donnelly, 2001). Possui flagelos peritríquios os quais conferem o tipo de mobilidade em cambalhota que é uma das características utilizadas no processo de identificação da bactéria (Pichi *et al.*, 1999).

### **1.2.1 – Mecanismos de transmissão de *Listeria monocytogenes***

Segundo Peason e Marth (1980), a bactéria *Listeria monocytogenes* pode infectar o Homem e outros animais pela via oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital.

Os estudos ligados ao esclarecimento do potencial patogénico da bactéria atingiram números significativos após o surto de listeriose ocorrido nos Estados Unidos da América na década de 80 devido ao consumo de queijo de pasta mole contaminado com *L. monocytogenes*. Neste estudo foram explorados aspectos não só ao nível celular como também moleculares e genéticos (Altekruse *et al.*, 1998).

## 1.2.2 – Mecanismo de Invasão celular

As bactérias pertencentes ao género de *Listeria* são patogénicas invasivas capazes de induzir a sua própria internalização em variadíssimos tipos de linhas celulares. Destacam-se as células epiteliais (Gailard *et al*, 1987; Mengaud *et al*, 1996; Portnoy *et al*, 1998), os fibroblastos (Kunh *et al*, 1988; Sun *et al*, 1990) os hepatócitos (Dramsi *et al*, 1995; Gregory *et al*, 1996; Wood *et al*, 1993), as células endoteliais (Drevets *et al*, 1995; Greiffenberg *et al*, 2000; Parida *et al*, 1998) e vários tipos de células nervosas incluindo neurónios (Dramsi *et al*, 1998).

Uma vez dentro das linhas celulares a bactéria *L. monocytogenes* é capaz de desenvolver o seu ciclo infeccioso que possui características muito específicas.

### 1ª Fase: Internalização

O ciclo começa com a adesão da bactéria à célula eucariota e a subsequente internalização na célula hospedeira. A invasão de células não fagocíticas implica um mecanismo do tipo “Zipper”, no qual a bactéria se afunda gradualmente nas estruturas da superfície da célula hospedeira até que é finalmente englobada.

O facto de as células de *Listeria monocytogenes* possuírem a capacidade de infectar tantos e tão distintos tipos de células leva a crer que a mesma é capaz de reconhecer diferentes receptores das células eucariotas. A bactéria *L. monocytogenes* também é bem sucedida na internalização quando se encontra na ausência de soro o que sugere que as interacções não opsonicas ligando – receptor também estão envolvidas no reconhecimento da célula hospedeira (Pierce *et al*, 1996).

Os receptores da célula hospedeira usados por *Listeria spp.* incluem a proteína transmembrana E-caderina (Mengaud *et al*, 1996), o receptor Met do factor de crescimento hepático (HGF) (Shen *et al*, 2000), e componentes da matriz extracelular

como o sulfato de heparano proteoglicanos (HSPG) e a fibronectina. (Gilot *et al*, 1999). Os ligandos bacterianos identificados até à data são todos proteínas de superfície, como as Internalinas (InlA e InlB), a proteína polimerizadora de actina (Act A), a p60, a Ami uma autolisina com um domínio C-terminal responsável pela ligação à parede celular muito semelhante à InlB, e finalmente a Lap, uma proteína de superfície com 104 KDa envolvida na aderência e fixação às células Caco-2 (Portnoy *et al*, 1988).

### **2ª Fase: Proliferação intracelular**

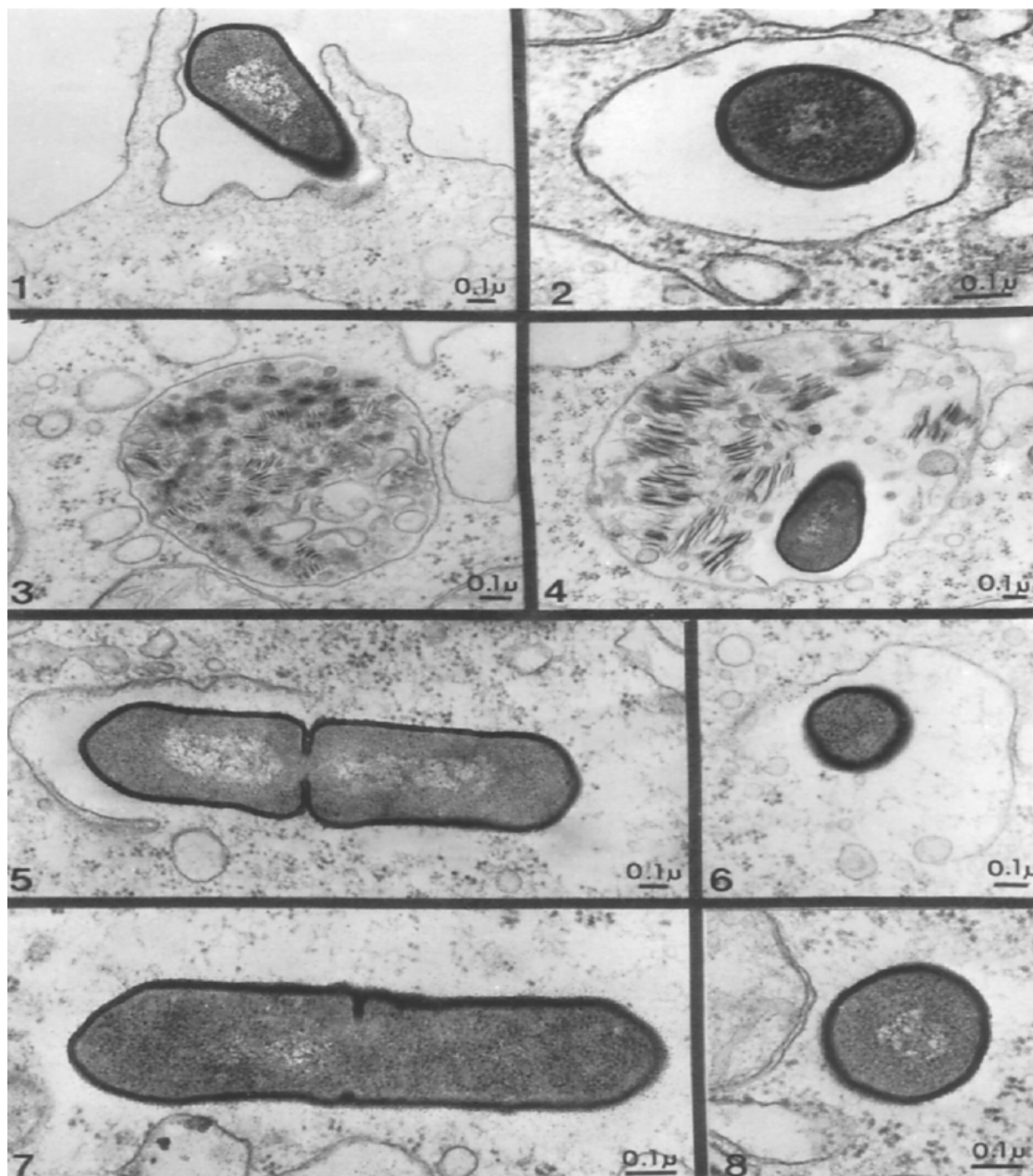
Durante a invasão a bactéria *L. monocytogenes* encontra-se no interior de um vacúolo celular. Pouco se sabe sobre as características e conteúdo deste vacúolo, mas é um facto que o mesmo se torna acidificado pouco depois de incorporar a bactéria (Beauregard *et al*, 1997) Aproximadamente 30 minutos depois da incorporação, a bactéria começa a destruir o fagossoma membranar e 2 horas depois cerca de 50% da população bacteriana está livre no citoplasma (Tilney *et al*, 1989). Este passo da destruição da membrana é essencial para a sobrevivência e proliferação da bactéria (Goebel *et al*, 1997) e é guiada pela hemolisina em combinação com as fosfolipases.

Uma vez no citosol a bactéria multiplica-se com um tempo de duplicação de aproximadamente 1 hora (Gailard *et al*, 1987; Portnoy *et al* 1988), isto é, aproximadamente três vezes mais lento que num meio rico.

As bactérias intracitoplásmicas são imediatamente rodeadas por uma nuvem fina de fibras compostas por filamentos de actina que posteriormente (2h pós-infecção) se organizam numa cauda de actina de aproximadamente 40 µm até um dos pólos da bactéria.

Esta cauda de actina consiste em dois conjuntos de filamentos cruzados, um deles formado por um feixe de actina longo e axial e o outro por filamentos pequenos e organizados ao acaso. O facto de os filamentos de actina se organizarem num pólo dá à

bactéria uma energia de propulsão que chega a atingir uma velocidade de  $0.3 \mu\text{m} / \text{s}$ . O movimento das células de *Listeria* deixa um rasto de F-actina iniciando-se a despolarização no pólo distal. Este movimento ocorre ao acaso, daí algumas bactérias atingirem a periferia da célula entrando em contacto com a membrana empurrando-a até que a mesma comece a formar pseudopodes com uma bactéria na ponta. Estes pseudopodes penetram a célula vizinha sã e são englobados por fagocitose resultando na formação de um fagossoma secundário envolvido por uma dupla membrana, sendo a membrana interna originária da célula dadora. As bactérias têm a capacidade de escapar rapidamente deste novo vacúolo ao dissolverem a sua dupla membrana, atingirem o citoplasma e iniciarem um novo ciclo infeccioso.



**Figura 2** - Secções finas de macrófagos infectados com *Listeria* por 30 min. 1) A bactéria *Listeria monocytogenes* na superfície do macrófago, 2) A bactéria que foi internalizada num endossoma. 3) Um membro da família dos lisossomas contendo material membranar. 4) A bactéria *Listeria monocytogenes* é muitas vezes encontrada dentro destes corpos lisossomais 5) A bactéria *Listeria monocytogenes* que só está parcialmente rodeada pela membrana do lisossoma. Note-se que a membrana está intacta do lado esquerdo, no entanto a bactéria está em contacto directo com o citoplasma no lado direito. A membrana do lado direito desapareceu, presumivelmente

*Determinação dos genótipos de Listeria monocytogenes  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade*

porque terá sido solubilizada pela hemolisina. 6) Secção da bactéria *Listeria* que solubilizou parcialmente a membrana. 7) Corte longitudinal da bactéria *Listeria* que se libertou completamente da membrana endossomal e que se encontra livre no citoplasma. 8) Secção de uma bactéria *Listeria monocytogenes* que se encontra completamente livre no citoplasma. Barras de 0,1 µm (Adaptado de Tilney & Portnoy, 1989).

### 1.2.3 – Factores de virulência

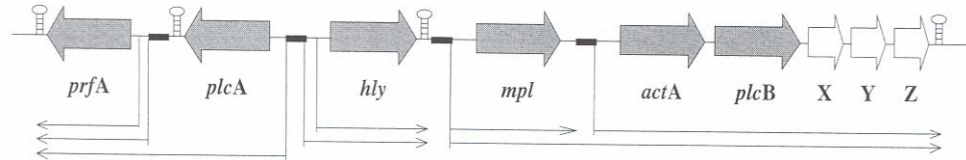
São vários os factores de virulência associados ao género *Listeria*, entre eles destacam-se a hemolisina, as fosfolipases, a actina A, as internalinas, a proteína associada à invasão (*p60*), entre outros, que são conhecidos como factores secundários (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

Cada um destes determinantes moleculares de virulência tem um papel fundamental no momento da colonização das células eucariotas hospedeiras.

A maioria dos genes de virulência conhecidos cujos produtos desempenham um papel no ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* encontra-se agrupada no cromossoma sob a denominação de *PrfA* (figura 4)

Este agrupamento compreende seis genes que estão actualmente bem caracterizados e que são eles, *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*. Os produtos destes genes de virulência consistem na listeriolisina (*hly*), a fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (*plcA*), a fosfolipase C específica para fosfatidilcolina (*plcB*), a metaloproteína (*mpl*), a proteína envolvida na polimerização da actina (*actA*) e o factor

PdfA de regulação positiva (*prfA*). Neste conjunto de genes encontram-se também três pequenas “open reading frames” (ORF) designadas por X Y e Z, para as quais não são conhecidas quaisquer funções (Adaptado de Kuhn & Goebel, 1999).



**Figura 3** – O agrupamento de genes de virulência da bactéria *L. monocytogenes*. As caixas a preto representam as zonas correspondentes ao PrfA e as setas representam os transcritos. (Adaptado de Kuhn & Goebel, 1999)

Os genes de internalina *inlA*, *inlB* e *inlC* que codificam a produção de internalina, *InlB* e *InlC* respectivamente, o gene *iap* que codifica a proteína Iap ou P60 e outros genes que se julga possuírem um desempenho na virulência da bactéria encontram-se localizados fora do agrupamento PrfA. Porém a maioria destes últimos encontram-se conectados ao *cluster* de genes de virulência assim como são regulados pelo activador transcripcional *prfA* (Adaptado de Kuhn & Goebel, 1999).

#### 1.2.3.1 – A proteína associada à invasão (*Iap*)

A proteína associada à invasão, designada por Iap ou P60 foi a primeira enzima bacteriolítica (autolisina) descrita para *L. monocytogenes*. A proteína p60 é codificada pelo gene *iap* ou como foi designado mais recentemente por *cwhA* (Pilgrim

*et al.* 2003). A expressão deste gene é independente do operão PrfA e é apenas controlada ao nível pós-transcricional. Proteínas homólogas da p60 são produzidas em todas as espécies de *Listeria*, no entanto em cada uma das espécies existem diferenças específicas ao nível da sequência de aminoácidos que permitem inclusivamente a sua identificação usando a técnica de Reacção em cadeia da polimerase (PCR) ou ensaios imunológicos (Bubert *et al.* 1992; Köhler *et al.* 1990; Bubert *et al.*, 1999).

A autolisina P60 é classificada como uma endo-N-acetilmuramidase (Wuenscher *et al.*, 1993). No início da fase estacionária apenas 25% desta autolisina encontra-se associada à célula (Ruhland *et al.*, 1993). As funções da P60 até agora identificadas são a participação na separação celular, bem como na aderência e invasão da *L. monocytogenes* a células mamíferas hospedeiras (Kuhn & Goebel, 1989). Verificou-se que, ao expor mutantes de *L. monocytogenes* não invasivos à acção da proteína P60, estes readquirem a capacidade invasiva. Deste modo, esta proteína foi associada à virulência, estabelecendo-se uma relação entre os componentes da superfície celular da bactéria *L. monocytogenes* e o seu potencial patogénico (Paquet *et al.*, 1986, Tabouret *et al.*, 1992). Foi igualmente demonstrada a relação entre uma autolisina e a virulência noutras espécies patogénicas, nomeadamente para a espécie *Streptococcus pneumoniae* em que se verificou que mutantes negativos para a autolisina apresentam uma virulência marcadamente reduzida quando comparados com as estirpes normais (Berry *et al.*, 1989, 1992; Canvin *et al.*, 1994).

### 1.3 – A doença Listeriose

Em humanos as manifestações associadas à bactéria *L. monocytogenes* incluem meningoencefalite, sintomas de gripe, baixo grau de septicemia no período pré-natal, síndrome de mononucleose, septicemia em adultos, pneumonia, endocardites, abscessos localizados, lesões cutâneas papular ou pustular, conjuntivites, uretrites e ocorrência de abortos (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

Os grupos de risco para esta patologia incluem os recém-nascidos, grávidas, indivíduos na faixa etária acima dos 60 anos e doentes imunodeprimidos. O índice de mortalidade nestes casos pode variar entre 20 a 30% (Rainaldi *et al.*, 1991; ICMSF, 1991; McLauchlin, 1996; Rocourt, 1997).

As mulheres grávidas consistem num grupo de alto risco, uma vez que a infecção pode ser transmitida para o feto e causar o aborto, nadomorto ou parto prematuro. Geralmente as gestantes não apresentam sintomatologia característica, podendo ocorrer em alguns casos sintomas semelhantes a uma constipação, com febre, mialgia e cefaleia. A bactéria atinge o feto através da corrente sanguínea da mãe, (infecção transplacentária) provocando aborto geralmente no terceiro trimestre de gestação ou provocando doença no recém-nascido. Cerca de 10% dos recém-nascidos acometidos por meningite podem apresentar danos secundários (Rocourt *et al.*, 1996). A incidência de listeriose em gestantes varia de 4,7 a 30 casos por 100 000 nascimentos.

Nos indivíduos imunodeprimidos ou idosos, pode ocorrer geralmente meningite ou meningoencefalite, devido ao tropismo do microrganismo pelo sistema nervoso central. Os casos de meningite apresentam letalidade de 43,8%, o que leva a concluir que indivíduos com o sistema imunológico comprometido são mais susceptíveis a estas doenças (Pearson e Marth, 1980; Davies *et al.*, 1984; Lovett, 1989; Twedt, 1994).

## 1.4 – Contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes* e implicações para a saúde pública

Os casos de Listeriose são frequentemente associados à ingestão de alimentos contaminados durante a sua produção, especialmente alimentos cozinhados e alimentos prontos para consumo (Cox *et al.*, 1989; Bille 1990; Salvat *et al.*, 1995; Aureli *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2005).

Foram reportados vários surtos de Listeriose associados a produtos lácteos contaminados, particularmente queijo, casos estes, ocorridos nos Estados Unidos da América (Linnan *et al.*, 1988), Europa (Bille 1990; Goulet *et al.*, 1995) e Japão (Makino *et al.*, 2005).

Os produtos prontos a consumir apresentam um alto potencial de sofrer uma contaminação, esta pode ocorrer por contaminação directa ou por contacto com as superfícies e equipamento que possa estar contaminado por ter previamente contactado com alimentos crus (Mena *et al.*, 2004). A bactéria pode igualmente colonizar todo o ambiente de processamento dos alimentos, tal como os utensílios e as bancadas (Wenger *et al.*, 1990; Lawrence e Gilmour, 1995; Destro *et al.*, 1996; Giovannaci *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 1999; Rorvik, 2000; Fonnesbech-vogel *et al.*, 2001). Em algumas linhas de produção, esta colonização consiste num mecanismo primário de contaminação do produto final. É o que acontece no caso dos queijos manufacturados (Hodges e Kimball, 2005).

Foi detectado um caso pontual de abcesso cerebral causado por *L. monocytogenes* num jovem de 24 anos de idade na Alemanha (Smiatecz *et al.*, 2005)

Em Portugal a listeriose não consiste numa doença de declaração obrigatória, porém alguns estudos já descreveram a presença de Listeriose humana em Portugal

---

*Determinação dos genótipos de Listeria monocytogenes  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade*

(Lecour *et al.*, 1987). No estudo conduzido por Almeida *et al.* (2006), foram identificados 35 casos entre o ano de 1994 e 2003. Estes casos foram obtidos nos serviços de patologia clínica de 23 hospitais assim como do Instituto Nacional de Saúde da cidade do Porto. De acordo com estes dados reporta-se que o número de casos seja se 1,4 por milhão de habitantes durante o ano de 2003. Foram também isoladas estirpes de peixe importado (Duarte *et al.*, 1999), assim como se verificou a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos alimentares de venda pública, tanto prontos para consumo como alimentos crus (Guerra *et al.*, 2001; Mena *et al.*, 2004; Pintado *et al.*, 2005).

De modo a apostar na prevenção, os regulamentos de segurança alimentar tendem a adoptar uma tolerância-zero para *L. monocytogenes* nos produtos prontos para consumo (Gallagher *et al.*, 2003). Porém, como os casos clínicos de listeriose estão geralmente associados a elevadas quantidades de *L. monocytogenes* (Dalton *et al.*, 1997; Farber & Peterkin, 1991) e como é difícil erradicar a bactéria do ambiente do processamento dos alimentos (Gravani *et al.*, 1999), a Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para os alimentos concluiu que 100 CFU de *L. monocytogenes* por grama de alimento é aceitável para os consumidores que não pertencem aos grupos de risco (Nogva *et al.*, 2000; Phillips *et al.*, 1998). Assim sendo, um pré-requisito para a adopção deste critério menos restritivo consiste na existência de métodos laboratoriais apropriados para a diferenciação entre *L. monocytogenes* e *L. innocua* assim como que permitam a quantificação específica e precisa de *L. monocytogenes* nos alimentos.

## 1.5 - Métodos de detecção de *Listeria monocytogenes*

As técnicas tradicionais desenvolvidas desde 1980 para a detecção de *L. monocytogenes* não são suficientemente rápidas para assegurar que não ocorra contaminação dos produtos alimentares antes destes serem consumidos. Os regulamentos que limitam a contaminação de alimentos a “tolerância-zero” têm consistido numa força impulsionadora para o desenvolvimento de métodos que facultem resultados rápidos. A necessidade de desenvolver métodos mais rápidos e precisos de detecção de *L. monocytogenes* advém também do facto da semelhança encontrada entre *L. monocytogenes* e outros membros da família *Listeria*.

Os métodos microbiológicos clássicos para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* consistem em crescimento em meio selectivo, o qual pode incluir incubação a baixas temperaturas (Farber *et al.*, 1991; Klinger *et al.*, 1998). Foram também desenvolvidos diversos meios de crescimento que permitem apenas o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Porém, embora tenham sido executados diversos estudos comparativos, nenhum dos métodos microbiológicos foi apontado como suficientemente superior de modo a ser adoptado a nível universal (Brackett *et al.*, 1990).

Nos últimos tempos foram desenvolvidos métodos de detecção de *L. monocytogenes* baseados em sistemas imunológicos assim como sistemas de sondas de ácidos nucleicos individuais ou acoplados a reacções de amplificação. A sonda de ADN quimioluminescente AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, EU) tem sido aplicada na identificação rápida de estirpes de *L. monocytogenes*. Este teste é feito em 30 minutos e tem mostrado elevada especificidade para *L. monocytogenes* (Ninet *et al.*, 1992). Outra sonda disponível é a Gene-Trak *L. monocytogenes* assay (Gene-Track systems,

Farmingham, EU), no entanto, neste último método, as colónias de *L. monocytogenes* atípicas necessitam de identificação molecular adicional (Allerberger *et al.*, 1997). Factores como a simplicidade, o custo, a velocidade e a sensibilidade são de extrema importância na escolha. Os métodos baseados na amplificação de ácidos nucleicos apresentam uma sensibilidade superior quando comparados com métodos de sondas de ácidos nucleicos ou imunoensaios (Batt, 1999). Por outro lado, a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) consiste num método mais complicado em termos de organização do método assim como na operacionalidade do mesmo (Batt, 1999). Porém actualmente este método já é de fácil manipulação de modo a ser utilizado na rotina de laboratórios de investigação e laboratórios clínicos.

### **1.5.1 – Técnica de *Polymerase Chain Reaction*, PCR**

O advento da biologia molecular foi certamente um dos maiores passos das ciências biológicas durante o século XX. A descoberta da Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) trouxe enormes benefícios tais como o sequenciamento de genomas, a rápida determinação da paternidade e o rápido diagnóstico de doenças infecciosas.

Recentemente, uma inovação tecnológica da técnica PCR, designada PCR em Tempo Real, vem adquirindo espaço nos laboratórios de pesquisa e nos diagnósticos clínicos. Esta técnica permite obter resultados quantitativos assim como o acompanhamento da reacção e apresentação dos resultados de forma mais rápida e precisa, em relação à PCR que apresenta apenas resultados qualitativos.

A Reacção em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), consiste numa metodologia que pode ser totalmente executada *in vitro*. A

técnica de PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu posteriormente em 1994, o prêmio Nobel.

A PCR possibilita a síntese de fragmentos de ADN, utilizando a enzima ADN-polimerase, a mesma que participa na replicação do material genético nas células. Esta enzima sintetiza uma sequência complementar de ADN desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*, em inglês) já se encontre ligado a uma das cadeias do ADN no ponto escolhido para o início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência com bilhões de cópias (Mullis, 1990).

O desenvolvimento da técnica de amplificação de segmentos de ADN utilizando a PCR abriu enormes perspectivas para a análise de genes, diagnóstico de doenças genéticas e detecção de agentes infecciosos como o citomegalovírus, vírus da hepatite B e C, herpes vírus simplex, vírus da rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Chlamydia trachomatis*, *Helicobacter pylori*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Pneumocystis carinii*.

O avanço da ciência no estudo dos genes trouxe para a rotina dos laboratórios desta área ferramentas que permitem o diagnóstico a nível molecular. No caso das doenças genéticas, o desenvolvimento permanente de novos protocolos permite a pesquisa de pequenas alterações na sequência do ADN, como por exemplo a fibrose cística.

#### **1.5.1.1 – Detecção de *L. monocytogenes* por PCR**

Os métodos convencionais de detecção de *L. monocytogenes* dependem de muito tempo para obter resultados e requerem confirmação bioquímica individual das

espécies nas colónias isoladas (Donnelly, 1999). A técnica de PCR tem como vantagem não depender de tanto tempo para identificar o microrganismo obtendo assim resultados mais rápidos. Outra vantagem a realçar consiste no facto desta técnica detectar quantidades muito baixas de ADN através da amplificação de sequências que são únicas no microrganismo alvo. Este factor permite assim uma detecção a concentrações mais baixas de microrganismo patogéneo quando comparado com os métodos tradicionais.

Uma larga variedade de ensaios baseados em PCR foram desenvolvidos para *L. monocytogenes*, os quais possuem como alvo uma diversidade de sequências genéticas distintas. Estas sequências derivam maioritariamente de genes de virulência os quais são únicos para *L. monocytogenes* e essenciais para a patogenicidade do organismo. Dentro dos factores de virulência previamente referenciados, foram elaborados métodos de detecção por PCR para os seguintes:

- listeriolisina (*hlyA*), gene que codifica uma hemolisina dependente de thiol que se encontra envolvida na evasão dos vacúolos intracelulares (Basal, 1996; Bassler *et al.*, 1995; Bohnert *et al.*, 1992; Bsat *et al.*, 1993; Furrer *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 1992);
- Proteína associada à invasão (*iap*) (Bubert *et al.*, 1992; Herrman *et al.*, 1995; Manzano *et al.*, 1996);
- Fosfolipase B (*plcB*) (Cooray *et al.*, 1994);
- Factor associado à hipersensibilidade retardada (DTH) (Wernars *et al.*, 1991).

Para além dos genes de virulência, existem outras sequências que são únicas na bactéria *L. monocytogenes* e que podem servir como alvo nos ensaios de PCR. O operão de ARN ribossomal assim como as suas regiões intergenicas consistem num destes tipos

de sequências pois possuem um elevado nível de conservação entre as estirpes de *L. monocytogenes* (Greisen *et al.*, 1994; Hermann *et al.*, 1995).

### 1.5.2 – A técnica de PCR em tempo real

O aparecimento do PCR em tempo real mudou drasticamente a visão dos métodos de quantificação de fragmentos de ADN e ARN. A técnica de PCR em tempo real permite obter os dados aquando a ocorrência do processo, combinando assim a amplificação e a detecção num único passo. Tal é permitido utilizando uma variedade de químicos fluorescentes diferentes que correlacionam a concentração do produto de PCR com a intensidade da fluorescência. (Higuchi *et al.*, 1993).

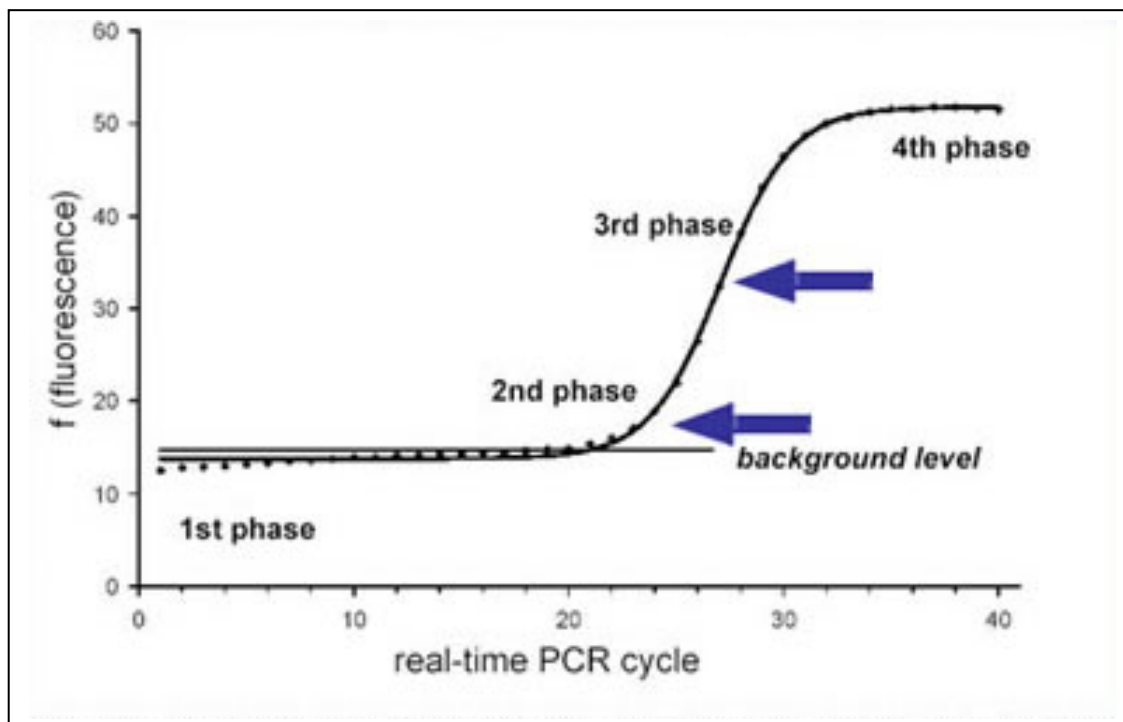
O PCR em Tempo real quantifica os ácidos nucleicos de forma precisa com alta reprodutibilidade pelo facto da determinação dos valores da reacção ser feita na fase exponencial da mesma. As reacções são caracterizadas pelo ciclo de PCR em que a amplificação alvo é detectada, o ponto que detecta o ciclo no qual a reacção atinge o limiar da fase exponencial é designado por *Cycle Threshold* ( $C_T$ ), ou seja, o valor de tempo em que a intensidade de fluorescência é superior à fluorescência base. Este ponto permite a quantificação exacta e reprodutível com base na fluorescência obtida. Consequentemente, quanto mais elevada a quantidade de ADN na amostra inicial, mais rapidamente surge um aumento do sinal de fluorescência, originando um  $C_t$  mais baixo.

A emissão por parte dos compostos fluorescentes dá origem a um sinal que aumenta em proporcionalidade directa com a quantidade de produto de PCR. Como tal, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade

de produto amplificado (<http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp,2004>). O composto fluorescente mais utilizado é o SYBR®Green.

O PCR em tempo real requer um equipamento que é composto por um termociclador com sistema óptico para a excitação da fluorescência e obtenção da emissão, um computador com um software para aquisição de dados e análise final da reacção. Estas máquinas, disponíveis de diversos fabricantes diferem entre si em vários factores. A capacidade de amostras consiste num dos factores. O método de excitação pode ser através de lasers ou fontes claras do espectro largo com filtros ajustáveis. A sensibilidade total é também um factor variável assim como o software para o processamento dos resultados (<http://www.ambion.com/techlib/tn/81/>)

Existem muitos benefícios na utilização do PCR em tempo real em comparação com outros métodos de quantificação de expressão genética. Os ensaios de PCR em tempo real podem detectar diferenças de expressão com uma diferença entre amostras tão baixa como 23% (Gentle *et al.*, 2001), assim como baixos coeficientes de variação (14,2 % para SYBR Green). A maior desvantagem para o PCR em tempo real consiste em que este requer equipamento e reagentes dispendiosos. Por outro lado, devido à sua extrema sensibilidade, torna-se imperativo executar minuciosamente um desenho experimental assim como uma normalização das técnicas utilizadas de modo a obter resultados precisos.



**Figura 4** – As quatro fases distintas da reacção de PCR em tempo real. Adaptado de <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3084>

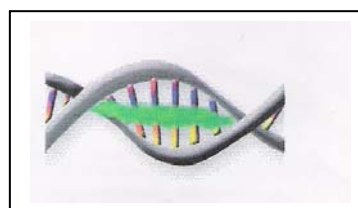
A técnica de PCR pode ser dividida em quatro fases principais (figura 4): A fase linear, fase exponencial inicial, fase exponencial e fase *plateau*. (Tichopad *et al.*, 2003). Durante a fase linear, geralmente correspondente aos primeiros 10-15 ciclos, o PCR encontra-se na fase inicial e a emissão de fluorescência em cada ciclo ainda não atingiu a fluorescência base. É nesta fase que é calculada a fluorescência base. Na fase exponencial inicial, o valor de fluorescência atinge um patamar onde é suficientemente elevada (geralmente 10 vezes o desvio padrão da linha base). O ciclo no qual tal acontece é designado por  $C_T$  na literatura ABI PRISM<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ou “crossing point” ( $C_P$ ) na literatura do LightCycler<sup>®</sup> (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) (Heid *et al.*, 1996; Von Ahsen *et al.*, 1999). Este valor é representativo do número de cópias inicial na amostra inicial e é utilizado para calcular os resultados experimentais (Heid *et al.*, 1996). Durante a fase log-linear, o PCR atinge o período de maior amplificação sendo que o produto de PCR duplica após

cada ciclo nas condições ideais de reacção. Finalmente a fase *plateau* é atingida quando os componentes da reacção se encontram em quantidades limite e a intensidade fluorescente não é utilizada para os cálculos dos dados (Bustin *et al.*, 2000)

#### 1.5.2.1 - Fluoróforos – SYBR® Green

Ao fluoróforos são moléculas que absorvem e emitem luz num comprimento de onda específico. Os sistemas de detecção da reacção PCR em Tempo Real utilizam estas moléculas de modo a proporcionar o acompanhamento da reacção ao longo da progressão dos ciclos.

O SYBR® Green liga-se entre a cadeia dupla de ADN (FIGURA 5) e quando submetido a uma excitação provocada pela emissão de luz por parte do sistema



**Figura 5-** Molécula de SYBR® Green entre a cadeia dupla de ADN.  
Adaptado de Novais & Alves, 2004.

óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. A sua utilização apresenta como vantagens o facto de ser um reagente de baixo custo, ser de fácil manuseamento assim como o facto de apresentar uma alta sensibilidade dos resultados obtidos. Como desvantagem apresenta o facto de este se ligar a todo o ADN que apresente cadeia dupla, incluindo os possíveis dímeros que possam ser formados pelos *primers* utilizados, ou mesmo outros produtos não específicos o que pode levar a que se sobrestime a concentração do fragmento alvo. O SYBR® Green que não se encontra ligado ao ADN exibe uma fluorescência muito pequena, porém, apenas quando este se liga á cadeia dupla é que a fluorescência é realçada.

No início da amplificação, a mistura de reacção contém o ADN desnaturado, os *primers* e o SYBR® Green. As moléculas do SYBR® Green que não se encontram ligadas apresentam uma fluorescência fraca produzindo um sinal mínimo sendo este subtraído durante a análise do computador. Após o reconhecimento dos *primers*, algumas moléculas do SYBR® Green podem ligar-se na cadeia dupla previamente formada. Durante a polimerização catalizada pela enzima *Taq* ADN polimerase, as moléculas do SYBR® Green estabelecem ligação com o ADN recentemente sintetizado. Logo, a reacção é monitorizada de forma contínua e um aumento de fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa da desnaturação do ADN, as moléculas do SYBR® Green são libertadas e ocorre uma queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no final da etapa de extensão de cada ciclo de PCR permite monitorizar a quantidade crescente de ADN amplificado (Vitzthum *et al.*, 1999).

Para além do SYBR® Green as duas técnicas mais utilizadas são TaqMan® e Molecular Beacons, ambos com capacidade de hibridação o que permite uma transferência de energia de modo a facultar a quantificação.

#### 1.5.2.2- Técnica de PCR em tempo real na detecção de *L. monocytogenes*

A necessidade de obter um método de detecção e quantificação rápido e altamente específico que permitisse a prevenção e controlo da presença de *L. monocytogenes* nos alimentos, levou a que fossem desenvolvidos métodos que permitissem a detecção e quantificação da bactéria através da técnica de PCR em tempo real. A quantidade de ADN detectado por esta técnica é directamente proporcional à

população bacteriana presente na amostra. Como a quantificação se baseia na emissão de um sinal de fluorescência ao longo da progressão da reacção de PCR, não são necessárias manipulações pós - PCR. Esta característica reduz o risco de contaminação cruzada no laboratório assim como permite um elevado acompanhamento da reacção e automatização da mesma (Klein, 2002).

Foram desenvolvidos ensaios de PCR em tempo real para detecção de *L. monocytogenes* baseados na detecção dos genes *hly* e *iap* (Hein *et al.*, 2001; Hough, *et al.*, 2002; Koo *et al.*, 1999; Nogva *et al.*, 2000). Porém, enquanto que o gene *hly* é relativamente bem conservado em todas as estirpes de *L. monocytogenes*, o mesmo já não se passa com o gene *iap*. Embora este possua região conservadas nas extremidades 5' e 3', a região central é altamente variável e apresenta polimorfismos mesmo entre as estirpes do mesmo serótipo (Bubert *et al.*, 1992; Manzano *et al.*, 1997; Rasmussen *et al.*, 1995).

Rodríguez-Lázaro *et al.*, (2004) avaliaram o uso dos genes *hly* e *iap* como alvos na detecção e quantificação específica de *L. monocytogenes* pelo método de PCR em tempo real. Verificaram que os ensaios de detecção do gene *hly* apresentaram especificidade, sensibilidade e uma quantificação exacta. Porém o mesmo não foi observado nos ensaios cujo alvo consistiu no gene *iap*, sendo que apenas apresentaram resultados consistentes de quantificação quando se tratava de estirpes pertencentes ao mesmo serótipo.

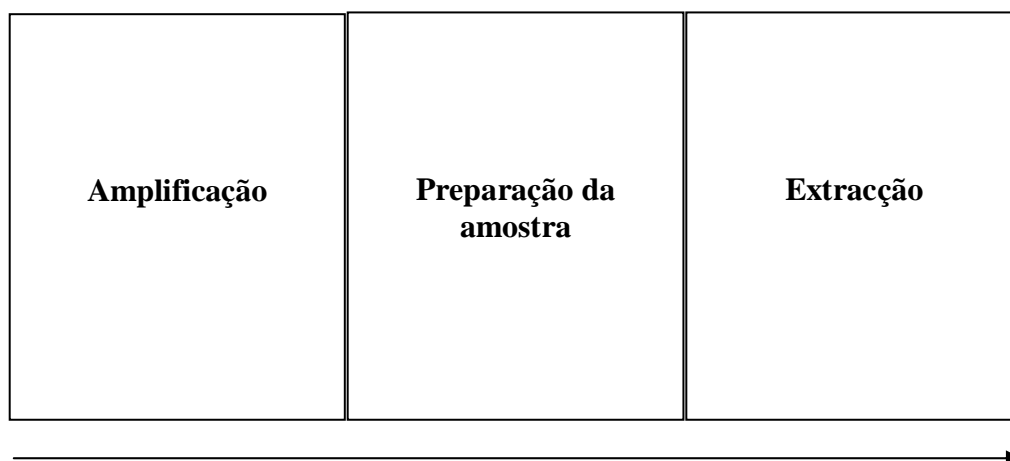
A utilização do PCR em tempo real consiste assim num método rápido e preciso para detectar e quantificar *L. monocytogenes* em amostras de fonte alimentar ou de outra origem (Heid *et al.*, 1996; Nogva *et al.*, 2000).

## 1.6 - Controlo e garantia de qualidade da técnica de PCR

A capacidade da reacção de PCR produzir uma grande quantidade de cópias de uma sequência alvo a partir de quantidades muito pequenas de ADN revela a extrema sensibilidade que faz do PCR um instrumento de diagnóstico com imensa potencialidade. Porém, esta característica faz com que seja necessário um cuidado extremo no decorrer da reacção de modo a evitar a ocorrência de resultados falsos – positivos. Os resultados falsos – positivos podem advir de contaminação entre amostras ou, mais vulgarmente ocorrido, a introdução na amostra de ADN do mesmo alvo previamente amplificado. Outras fontes de contaminação podem incluir ADN clonado e culturas de células virais.

A preparação dos reagentes consiste num dos pontos a considerar para uma boa realização do trabalho. Assim sendo, os reagentes de PCR devem ser aliquotados de modo a evitar uma sucessão de congelamento e descongelamento dos mesmos assim como para prevenir a contaminação dos mesmos. Os tubos de reagente, devem sofrer um “pulse” antes de retirar a tampa para utilização e esta deve ser retirada cuidadosamente de modo a evitar aerossóis.

Outro factor a ter em conta de modo a evitar resultados indesejáveis consiste numa correcta organização do trabalho. Deve existir assim uma separação física entre as diferentes etapas do PCR, sendo estas a extracção do ácido nucleico, a preparação da mistura de reacção e a amplificação da mesma.



**Figura 6-** Indicação do fluxo de trabalho na preparação de uma reacção de PCR.

A preparação da mistura de reacção, sem ácido nucleico deve ser realizada num espaço isolado de qualquer material biológico. Pode ser assim uma câmara de fluxo laminar, que seja esterilizada através de raios U.V. Os reagentes a utilizar devem ser preparados e aliquotados nesta zona.

A extração do ácido nucleico deve ser feita numa zona do laboratório onde não se manuseiem os produtos de anteriores reacções. Deve ser nesta área que se adiciona o ácido nucleico à mistura de reacção anteriormente preparada.

Por fim a zona de amplificação deve consistir num espaço onde se encontrem os equipamentos de PCR e é recomendável que esteja fisicamente isolado das zonas anteriores.

É recomendado que seja incluído um controlo positivo, este deve ser amplificado de forma fraca mas consistente e deve ser do mesmo tipo que o ácido nucleico analisado. Um controlo positivo fortemente amplificado pode ser uma possível fonte de contaminação para as restantes amostras, daí que seja um facto a evitar. Deve também ser incluído na reacção um controlo de reacção que contenha todos os reagentes

necessários ao progresso da reacção com excepção do ADN, assim como um outro controlo negativo cujo ADN adicionado não apresente uma sequência similar ao alvo.

Há que referir ainda que os diferentes reagentes, como água desionizada e soluções tampão, assim como, os materiais utilizados, no caso das pontas e tubos devem ser esterilizados através da autoclavagem a calor húmido (120 °C, 15 minutos) (Health Protection Agency, 2006).

## **1.7 - Objectivos**

O presente trabalho teve como principal objectivo a determinação dos genótipos de estirpes isoladas de queijarias portuguesas e outros alimentos incluindo estirpes clínicas através da implementação da técnica de PCR em tempo real. A avaliação da citopatogenicidade destas estirpes constituiu o segundo objectivo deste estudo.

## 2- Material e Métodos

### 2.1 – Material

#### 2.1.1 – Estirpes de *Listeria monocytogenes*

Na realização deste estudo foi utilizado um grupo de estirpes de *L. monocytogenes* provenientes de queijarias, alimentos ou de origem clínica. Na tabela I apresentam-se as estirpes analisadas. As estirpes foram mantidas a -80 °C. Sempre que necessário foram recuperadas em meio Tryptone Soya Broth Agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido).

**Tabela I** – Estirpes de *L. monocytogenes* utilizadas.

Estirpe	Origem	Serótipo	Referência
<b>A9</b>	Queijaria	1/2b	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>T8</b>	Queijaria	4b	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA11</b>	Queijaria	4b	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G8</b>	Queijaria	4b	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G22/2</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA26/4</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>T46A</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA64/1</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>T58/2</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>C882</b>	Queijo	4b	INETI-DTIA, Faleiro <i>et al.</i> 2003
<b>C897</b>	Queijo	1/2a	INETI-DTIA, Faleiro <i>et al.</i> 2003

<b>C681</b>	Queijo	4b	INETI-DTIA, Faleiro <i>et al.</i> 2003
<b>C895</b>	Queijo	1/2a	INETI-DTIA, Faleiro <i>et al.</i> 2003
<b>CLIP 1.04</b>	Carne	1/2a	Instituto Pasteur, França
<b>CLIP 2.04</b>	Carne	4b	Instituto Pasteur, França
<b>CLIP 6.04</b>	Peixe	3a	Instituto Pasteur, França
<b>SLU1922</b>	Clínica	4b	Loncarevic <i>et al.</i> 1997
<b>SLU2157</b>	Clínica	1/2a	Ericsson <i>et al.</i> 1997
<b>EGD</b>	Clínica	1/2a	Trudeau Institute
<b>ScottA</b>	Clínica	4b	N/D
<b>SA21/2</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA2</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>A13</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>A29B</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G17C</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SLU725</b>	Galinha	1/2a	Swedish University of Agricultural Sciences
<b>SLU1927</b>	Carne	1/2a	Swedish University of Agricultural Sciences
<b>SLU797</b>	Peixe	1/2a	Swedish University of Agricultural Sciences
<b>BZ100</b>	Carne	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil
<b>BZ142</b>	Carne	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil
<b>CLIP 8.04</b>	Carne	1/2c	Instituto Pasteur, França
<b>CLIP 7.04</b>	Peixe	1/2b	Instituto Pasteur, França
<b>CLIP 9.04</b>	Peixe	4b	Instituto Pasteur, França
<b>10403S</b>	Clínica	1/2a	Portnoy <i>et al.</i> , 1988
<b>BZ3s1</b>	Peixe	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil

<b>BZ7s1</b>	Peixe	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil
<b>BZ2s1</b>	Peixe	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil
<b>SA1</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>A5</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA4</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>125/5</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA21/5</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA26/A</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA7</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G15/C</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G17/3</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G19/A</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G20/1</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G26/B</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA10</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA9</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G17/D</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G21/2</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SA26/E</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G20/D</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G21/A</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>G22/5</b>	Queijaria	N/D	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>BZ825</b>	Carne	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil
<b>BZ619</b>	Carne	N/D	FCF - Universidade S. Paulo, Brasil

<b>NCTC 7973</b>	Animal	N/D	Inglaterra
<b>TUMLIS6</b>	galinha	4a	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<b>ATCC19116</b>	n/d	4c	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<b>SLU547</b>	Aves	4c	Chambel <i>et al.</i> , 2007
<b>SLU549</b>	Ovelha	4a	Chambel <i>et al.</i> , 2007

Nota : N/D – não determinado

## 2.1.2 – Primers

### 2.1.2.1 - Primers utilizados na técnica de PCR

Para as reacções de detecção dos diversos genótipos através da técnica PCR foram utilizados *primers* específicos para cada genótipo assim como foram adicionados *primers* competitivos de forma a aumentar a especificidade das reacções. As sequências e especificidades dos mesmos encontram-se apresentadas nas tabelas II e III.

**Tabela II - Primers** específicos para cada genótipo, utilizados na técnica de PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
<i>iap</i> -412-I-F	TAC-TTA-ACT-GAC-AAA-GCA-GT	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -1047-I-R	ATT-CGT-ATT-AGT-ATT-TGA-GTT-TG	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -820-II-F	ACT-AAC-ACT-AAC-ACA-AAT-GC	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -1047-II-R	GGA-GTT-TGT-ATT-AGT-ATT-GGT-A	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -217-III-F	AAT-GAG-GTC-GCT-AAA-AAC-AC	Genótipo III	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -1047-III-R	TGT-GTT-CGT-GTT-TGT-ATT-TGT-G	Genótipo III	Schmid <i>et al.</i> , 2003

**Tabela III-** *Primers* competitivos adicionados a cada reacção de detecção dos diferentes génotipos pela técnica de PCR.

<b>Primer competitivo</b>	<b>Sequência 5'-3'</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
<i>iap-1-dd-II/III-F</i>	TAC-TTA-ACT-GAC-AAA-GTA-G*	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-1-dd-II-R</i>	ATT-CGT-ATT-GGA-GTT-TGT-ATT-A*	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-1-dd-III-R</i>	AGC-ATT-TGT-GTT-CGT-GTT-T*	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-2-dd-I/III-F</i>	ACK-AAY-ACA-AAT-ACW-GCT-M*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-2/3-dd-I-R</i>	AGT-ATT-TGA-GTT-TGT-ATT-AGT-AT*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-2-dd-III-R</i>	TGT-GTT-CGT-GTT-TGT-ATT-TGT*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-3-dd-I/-II-F</i>	GAG-GTK-GCT-GCT-GCT-G*	Genótipo III	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap-3-dd-II-R</i>	GGA-GTT-TGT-ATT-AGT-ATT-GGT*	Genótipo III	Schmid <i>et al.</i> , 2003

#### 2.1.2.2 - *Primers* utilizados na técnica de PCR em tempo real

De modo a detectar os diferentes génotipos através da técnica PCR em tempo real foram desenhados pares de *primers* e respectivos *primers* competitivos através da sequência do gene *iap* (anexo I), utilizando o programa Oligo, versão 4.0 (MedProbe, Oslo, Noruega). As sequências dos mesmos são indicadas nas tabelas IV e V. Para a reacção de detecção de genótipo II, utilizou-se porém, o mesmo par de *primers* utilizado na reacção de PCR anterior (tabela II). Tal escolha deveu-se ao facto deste par originar um produto de tamanho aceitável para uma reacção em tempo real (191 pb).

**Tabela IV** – *Primers* utilizados nas reacções de detecção dos diferentes genótipos através da técnica de PCR em tempo real.

<b>Primer</b>	<b>Sequência 5´-3´</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
G1-2F	GCA-ACG-CAA-CAA-CAA-ACA-GC	Genótipo I	Este estudo
<i>iap</i> -1047-I-R	ATT-CGT-ATT-AGT-ATT-TGA-GTT-TG	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -820-II-F	ACT-AAC-ACT-AAC-ACA-AAT-GC	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -1047-II-R	GGA-GTT-TGT-ATT-AGT-ATT-GGT-A	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
AAG3F	GAC-TGA-AGT-AAA-TGA-GGT-CG	Genótipo III	Este estudo
AAG3R	CTT-TGA-TGG-ACG-TAA-TAA-TG	Genótipo III	Este estudo

**Tabela V** – *Primers* competitivos adicionados nas reacções de detecção dos diferentes genótipos através da técnica de PCR em tempo real.

<b>Primer competitivo</b>	<b>Sequência 5´-3´</b>	<b>Alvo</b>	<b>Referência</b>
G1-2F-comp	ACA-ACA-CAA-CAA-CAA-ACA-GCA*	Genótipo I	Este estudo
<i>iap</i> -1-dd-II-R	ATT-CGT-ATT-GGA-GTT-TGT-ATT-A*	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>Iap</i> -1-dd-III-R	AGC-ATT-TGT-GTT-CGT-GTT-T*	Genótipo I	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -2/3-dd-I-R	AGT-ATT-TGA-GTT-TGT-ATT-AGT-AT*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -2-dd-III-R	TGT-GTT-CGT-GTT-TGT-ATT-TGT*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003
<i>iap</i> -2-dd-I/III-F	ACK-AAY-ACA-AAT-ACW-GCT-M*	Genótipo II	Schmid <i>et al.</i> , 2003

Os primers utilizados nas reacções de PCR e PCR em Tempo Real foram fornecidos por MWG-Biotech AG (Alemanha).

### 2.1.3- Invasão celular

De modo a elaborar o ensaio de determinação de invasão celular foram utilizadas células NIH3T3. A linhagem utilizada foi gentilmente cedida pelo Instituto Gulbenkian para a Ciência (IGC), Lisboa.

#### **Características gerais das células NIH3T3:**

**Origem** - Embrião de ratinho.

**Morfologia** – Fibroblastos

**Meio de Crescimento** – RPMI (Gibco) com 10% soro bovino fetal e 2 mM Glutamina.

**Condições de Crescimento** – 37 °C na presença de 5% CO<sub>2</sub>

**Tempo de duplicação** – O tempo médio de duplicação é de 20 horas

**Sub-culturas** – A tripsinação foi elaborada aquando a confluência da cultura. Foi utilizada solução de 0,25% tripsina-EDTA (Sigma, Madrid, Espanha). A cultura foi tripsinada numa razão 1:4 a cada 4 dias.

**Congelamento** – O congelamento das células foi feito utilizando um meio rico em DMSO (sulfoxido dimetil), “recovery cell culture freezing médium” (Gibco, Paisley, Reino Unido). As células foram conservadas a uma temperatura de -80 °C.

## 2.2 – Métodos

### 2.2.1– Extracção de ADN pelo método. - Guanidina, EDTA e Sarcosil (G.E.S.)

Cada estirpe de *L. monocytogenes* foi crescida em Tryptone Soya Broth Agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Desta cultura retirou-se uma ansada e suspendeu-se em 100 µl de solução de Tampão Lise (ver anexo II) suplementado com 2,4µg/ µl Lisozima. Deixou-se repousar durante 45 minutos a 35 °C. Adicionaram-se 500 µl de tampão GES (ver composição em anexo II), agitou-se fortemente e colocou-se no gelo durante 5 minutos, após os quais se adicionou 250 µl de acetato de amónia 10M homogeneizou-se e permaneceu em gelo durante 10 minutos. Decorrido este tempo, foram adicionados à mistura 500 µl da solução clorofórmio:alcoól isoamílico (24:1 v/v). De seguida, misturou-se por inversão e procedeu-se à centrifugação (18 890 g, 4°C, 10 minutos). Após a centrifugação o sobrenadante foi recolhido e transferido para um novo tubo ao qual foi adicionado metade do volume em isopropanol frio (Sigma, Madrid, Espanha). Procedeu-se à homogeneização e realizou-se uma nova centrifugação (13 000 rpm, 4°C, 1 minuto). O ADN precipitado foi lavado com 800 µl de etanol frio a 70% por três vezes. Após as lavagens o ADN obtido foi seco ao ar. Após a evaporação de todo o etanol, ressuspendeu-se o ADN obtido em 35 µl de água isenta de DNAses (Sigma, Madrid, Espanha).

Para avaliar a pureza e a concentração do ADN obtido foi determinada a absorvência por espectrofotometria utilizando o comprimento de onda de 260nm e 280nm. A qualidade do ADN extraído foi ainda avaliada por electroforese em gel de agarose 1% p/v.

### 2.2.2 – Amplificação de ADN por Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR)

O ensaio de detecção e amplificação dos diferentes genótipos de *L.monocytogenes* através da técnica de PCR, foi executado num aparelho “T1 thermocycler” (Biometra, Goettingen, Alemanha). Utilizaram-se os *primers* específicos para cada genótipo apresentados na secção 2.1.2.1.

À reacção de PCR foram igualmente adicionados *primers* competitivos, que têm como característica serem 2’3’-dideoxynucleotidos (ddNTP). Estes *primers* não emparelham no ADN dos organismos que não pertencem ao genótipo específico da análise em questão. Desta forma, a especificidade de cada reacção torna-se mais elevada assim como deixa de se observar o aparecimento de falsos positivos.

Para cada reacção de detecção de genótipo foi estabelecida a temperatura óptima de emparelhamento através de análises num PCR cyler com gradiente de temperatura “TGradient” (Biometra, Goettingen, Alemanha).

Após a especificação das condições óptimas de reacção que se encontram expostas na tabela VI, procedeu-se às respectivas reacções de amplificação.

Para cada reacção foi introduzido um controlo positivo que consistiu numa amostra de ADN de genótipo semelhante ao que se pretendia determinar assim como dois controlos negativos, um dos quais correspondia ao controlo da reacção (sem ADN) e o segundo com adição de ADN de outra bactéria (*Escherichia coli*).

Para cada estirpe em estudo, foram executadas 3 reacções de PCR em separado para cada um dos três genótipos a ser detectado.

**Tabela VI-** Condições utilizadas nos três tipos de reacção de detecção de genótipo num volume total de 50µl.

Par de primer	<i>iap-820-I-V/iap-1047-I-R</i>	<i>iap-420-II-V/iap-1047-II-R</i>	<i>iap-217-III-V/iap-1047-III-R</i>
Especificidade	Genótipo I	Genótipo II	Genótipo III
Concentração de primer (pmol/µl)	10	10	10
Concentração MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	25	25
Concentração ADN (ng/ µl)	30	30	30
Concentração Competidor (pmol/ µl)	10	10	0
Desnaturação inicial	94°C/ 4 min	94°C/ 4 min	94°C/ 4 min
Desnaturação	94°C/ 20 s	94°C/ 20 s	94°C/ 20 s
Temperatura de Emparelhamento	57°C	60°C	52°C
Tempo de alongamento (s)	15	20	40
Alongamento final	72°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 1min
Tamanho do produto final (pb)	615-645	195 - 201	804

### 2.2.3 – Electroforese em gel de agarose

O método padrão utilizado para separar, identificar e purificar fragmentos de ADN e ARN consiste na electroforese em gel de agarose. Esta técnica é rápida, simples

e possui uma capacidade de separar fragmentos de ácidos nucleicos com alta precisão. (Holme *et al.*, 1993)

A valores de pH neutro ou alcalino, os grupos fosfato do ADN conferem à molécula uma carga negativa uniforme. Esta carga permite que a molécula se mova em direcção ao ânodo quando sujeita a um campo eléctrico. Ao se realizar a electroforese numa matriz é possível separar moléculas que possuam dimensões diferentes. O tamanho das moléculas de ADN depende do comprimento da cadeia, logo as moléculas de ADN são classificadas por número de pares de bases. A matriz oferece uma menor resistência a moléculas de dimensão pequena, logo estas movem-se mais rapidamente. A razão do movimento da molécula com um tamanho particular depende da dimensão dos poros do gel, a qual é determinada pela concentração de agarose. Concentrações entre 0,5 e 2% são geralmente utilizadas para ADN com dimensões que variem de 200 a 50 000 pares de bases. A localização do ADN no gel pode ser determinada directamente através da inserção de uma concentração baixa de marcadores fluorescentes como brometo de etídio ou “SYBR green”. Este tipo de marcadores permite que o ADN seja visualizado directamente através de iluminação com luz ultravioleta. De forma a determinar o tamanho da molécula é incluído num dos poços do gel um marcador de massa molecular conhecida (Holme *et al.*, 1993).

Após se ter procedido às reacções de PCR para determinar o genótipo das estirpes em estudo, realizou-se a análise do produto da reacção através de uma electroforese em gel de agarose (2%, p/v). Em cada análise foi incluído um marcador com bandas de tamanho conhecido de modo a determinar a dimensão dos fragmentos resultantes da reacção de PCR.

#### **2.2.4- Ensaio de invasão celular de células NIH3T3 pela bactéria *Listeria monocytogenes***

De forma a testar a capacidade invasiva de cada genótipo foi elaborado um ensaio de invasão celular em células NIH3T3. O ensaio foi elaborado com um grupo de estirpes representativas dos três genótipos.

O ensaio foi organizado conforme descrito em Olier *et al.*, 2003. As estirpes de *L. monocytogenes* cresceram em meio BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) durante a noite a 30°C sem agitação. Na determinação da viabilidade bacteriana foi utilizado o método das gotas descrito por Miles and Misra, 1938. Nesta técnica utilizam-se microdiluições seriadas, na razão de 1:10, utilizando volumes de 100:900 µl. Um volume de 20 µl de cada diluição é inoculado em triplicado em placas de meio de infusão de cérebro e coração “BHI” (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) que posteriormente são incubadas a 30 °C por 24 horas.

Monocamadas confluentes de células NIH3T3 foram inoculadas com uma razão de 10 células bacterianas por cada célula NIH3T3, cerca de  $1,0 \times 10^6$  *L. monocytogenes* / poço e foi incubado numa estufa a 5%CO<sub>2</sub>, 37 °C durante 30 minutos. De forma a eliminar as células bacterianas extracelulares, lavou-se três vezes as monocamadas com solução fosfato salina (PBS) pH 7,3, após as quais se adicionou meio suplementado com 150 µg/µl de gentamicina. Aos 90 minutos pós-inoculação as células NIH3T3 foram novamente lavadas três vezes com PBS e procedeu-se à lise celular através de pipetagem vigorosa com água destilada fria. A contagem das células de *L. monocytogenes* intracelulares foi feita através da inoculação por espalhamento do lisado resultante em placas de BHI agar (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). A eficácia de

invasão é determinada como a percentagem de inóculo recuperado na contagem das células bacterianas intracelulares.

Cada ensaio foi constituído por três réplicas. Os controlos utilizados incluíram a utilização de uma estirpe de laboratório, a 10403S como controlo positivo e um controlo negativo em que não foi inoculada bactéria na monocamada de células.

De forma a garantir a esterilidade do meio de crescimento foi incluído um frasco de meio BHI sem inóculo por cada crescimento de *L. monocytogenes*, assim como em cada inoculação de meio BHI sólido para cálculo da viabilidade celular foi mantida uma placa sem inóculo como controlo negativo.

### **2.2.5 – Reacção de PCR em tempo real para detectar os diferentes genótipos de *L. monocytogenes***

O ensaio de detecção e amplificação dos diferentes genótipos de *L. monocytogenes* através da técnica de PCR em tempo real foi executado num aparelho icycleriq multicolor real time PCR detection system (BioRad, Hercule, EUA). Utilizaram-se os *primers* específicos para cada genótipo apresentados na secção 2.1.2.1. Foram adicionados *primers* competitivos, 2'3'-dideoxinucleótidos (ddNTP), a cada reacção de forma a obter a detecção e amplificação específica de cada genótipo. Os *primers* competitivos evitam a amplificação do ADN de outros genótipos que não o pretendido. As condições utilizadas para cada reacção, foram testadas previamente utilizando um termociclador com gradiente de temperatura de emparelhamento "TGradient" (Biometra, Goettingen, Alemanha). As condições de cada reacção estão indicadas na tabela VII.

Para cada reacção de determinação do genótipo foram incluídas três replicas utilizando um grupo de estirpes representativas dos três genótipos.

**Tabela VII-** Condições utilizadas nas reacções de detecção dos diferentes genótipos através da técnica PCR em tempo real num volume total de 25 µl.

Par de primer	G1-2FV/ <i>iap</i> -1047-I-R	<i>iap</i> -420-II-V/ <i>iap</i> -1047-II-R	AAG3F-V/AAG3R
Especificidade	Genótipo I	Genótipo II	Genótipo III
Concentração de primer (pmol/µl)	10	10	10
Concentração ADN (ng/ µl)	30	30	30
Concentração Competidor (pmol/ µl)	10	10	-
Desnaturação inicial	94°C/ 4 min	94°C/ 4 min	94°C/ 4 min
Desnaturação	94°C/ 20 s	94°C/ 20 s	94°C/ 20 s
Temperatura de Emparelhamento	61°C	60°C	60°C
Tempo de alongamento (s)	45	45	45
Alongamento final	72°C/ 45 s	72°C/ 45 s	72°C/ 45 s
Tamanho do produto (pb)	171	195 - 201	116

#### 2.2.5.1 – Linearidade, sensibilidade e gama de concentrações das reacções de detecção dos genótipos através da técnica de PCR em Tempo Real

Com base nos resultados de Glaser *et al.*, 2001, em que foi considerado que uma molécula de ADN da espécie *L. monocytogenes* apresenta um peso de 2,94 fg, realizou-se uma série de diluições de modo a obter amostras com valores de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ , 100, 10 e 1 molécula de ADN. Estas diluições foram feitas apenas para uma estirpe de cada genótipo, Utilizou-se assim a estirpe T58/2 para genótipo I, A9 para o genótipo II e 547 para o genótipo III.

Consequentemente, foram realizadas três réplicas para cada reacção de detecção de genótipo. Cada amostra foi analisada em triplicado por réplica de reacção assim como foi incluído em cada reacção uma amostra em branco onde não foi incluído ADN.

### 3- RESULTADOS

#### 3.1 – Determinação do genótipo de *Listeria monocytogenes*

Com o objectivo de determinar o genótipo de estirpes de *Listeria monocytogenes* isoladas de queijarias portuguesas e outros alimentos, assim como estirpes clínicas, foram reunidas para a respectiva análise 64 estirpes de *L. monocytogenes*.

A divisão das estirpes de *L. monocytogenes* pelos três genótipos é apresentada na tabela VIII, observou-se que no total de 64 estirpes testadas, 16 pertenciam ao genótipo I (25%), 44 ao genótipo II (69%) e apenas 4 pertenciam ao genótipo III (6%).

**Tabela VIII-** Genótipo das estirpes de *L. monocytogenes*.

Estirpe	Origem	Genótipo
10403S	Clínica	I
C897	Queijo	I
EGD	Clínica	I
T58/2	Queijaria	I
CLIP 1.04	Carne	I
SLU1922	Clínica	I
T46A	Queijaria	I
C895	Queijo	I
CLIP6.04	Peixe	I
SLU725	Galinha	I
SLU1927	Carne	I
SLU797	Peixe	I

BZ100	Carne	I
BZ142	Carne	I
CLIP8.04	Carne	I
NCTC7973	Animal	I
A9	Queijaria	II
ScottA	Clínica	II
G8	Queijaria	II
T8	Queijaria	II
SA11	Queijaria	II
C882	Queijo	II
C681	Queijo	II
G22/2	Queijaria	II
SA26/4	Queijaria	II
SA64/1	Queijaria	II
CLIP2.04	Carne	II
SLU2157	Clínica	II
SA21/2	Queijaria	II
SA2	Queijaria	II
A13	Queijaria	II
A29B	Queijaria	II
G17C	Queijaria	II
CLIP7.04	Peixe	II
CLIP9.04	Peixe	II
BZ3s1	Peixe	II

BZ7s1	Peixe	II
BZ2s1	Peixe	II
SA1	Queijaria	II
125/5	Queijaria	II
A5	Queijaria	II
SA4	Queijaria	II
SA21/5	Queijaria	II
SA26/4	Queijaria	II
SA7	Queijaria	II
G15/C	Queijaria	II
G17/3	Queijaria	II
G19/A	Queijaria	II
G20/1	Queijaria	II
G26/B	Queijaria	II
SA10	Queijaria	II
SA9	Queijaria	II
G17/D	Queijaria	II
G21/2	Queijaria	II
SA26/E	Queijaria	II
G20/D	Queijaria	II
G21/A	Queijaria	II
G22/5	Queijaria	II
BZ825	Carne	II
BZ619	Carne	II

---

TUMLIS6	Desconhecido	III
ATCC19116	Galinha	III
SLU547	Aves	III
SLU549	Ovelha	III

Para uma análise mais pormenorizada entre a origem das estirpes e o seu genótipo elaborou-se a tabela IX. Verifica-se que as estirpes de origem clínica (5) são na sua maioria de genótipo I (3). Já as estirpes de origem de queijaria testadas são maioritariamente genótipo II, sendo que do total de 34 estirpes apenas 2 pertencem ao genótipo I. As estirpes de origem animal analisadas (2) dividem-se entre o genótipo I e III. No que se refere às estirpes encontradas em produtos alimentares verifica-se que das 7 estirpes originárias de peixe 5 pertencem ao genótipo II e 2 ao genótipo I e das 8 estirpes encontradas em carne, 5 pertencem ao genótipo I e 3 ao genótipo II. Já as 4 estirpes de origem em queijo, dividem-se entre o genótipo I e II. Das 3 estirpes isoladas de carne de aves, 1 pertence ao genótipo I e 2 ao genótipo III. A origem da estirpe TUMLIS6, que pertence ao genótipo III é desconhecida.

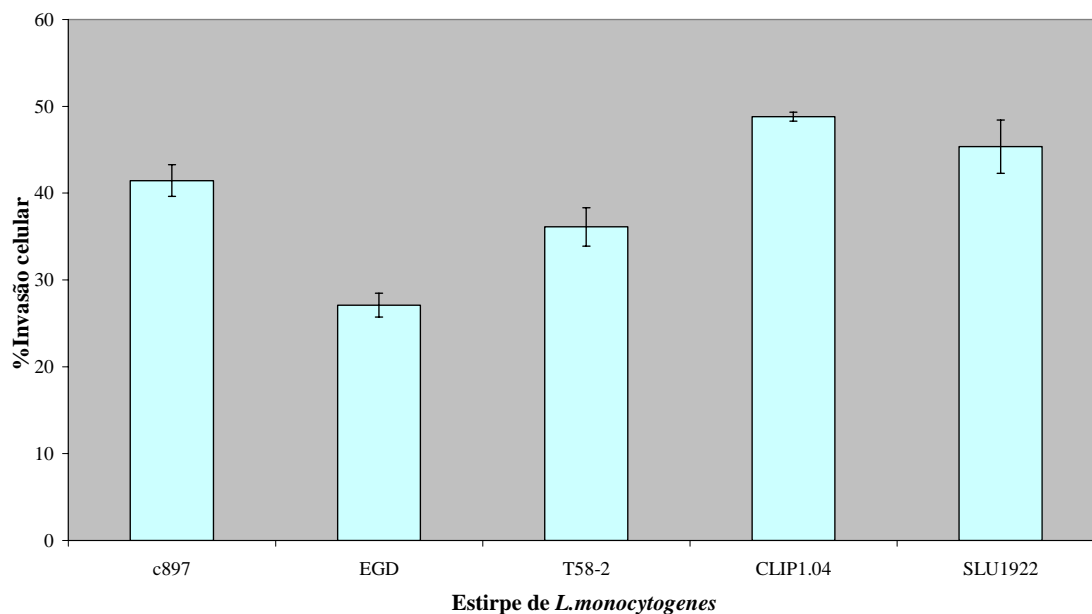
**Tabela IX** – Relação entre origem das estirpes de *L. monocytogenes* e o genótipo apresentado.

Origem	Total de estirpes	Genótipo		
		I	II	III
Carne	8	5	3	0
Aves	3	1	0	2
Peixe	7	2	5	-
Queijaria	34	2	32	-
Queijo	4	2	2	-
Clínica	5	3	2	-
Animal	2	1	-	1
Desconhecido	1	-	-	1

### 3.2 – Ensaio de Invasão celular de *L. monocytogenes* em células NIH3T3

De modo a se poder esclarecer se a cada um dos genótipos está associada uma capacidade invasiva particular, foi determinada a capacidade invasiva de um grupo de estirpes escolhidas entre a totalidade, utilizando células NIH3T3. É importante relembrar que o gene *iap* (invasion associated protein) no qual se baseia a determinação dos genótipos é um dos factores de virulência que está associado com a capacidade invasiva das estirpes de *L. monocytogenes* (Kuhn & Goebel, 1989). Na figura 7 está

representada a capacidade de invasão das estirpes *L. monocytogenes* C897, EGD, T58/2, CLIP 1.04 e SLU1922, que pertencem ao genótipo I.

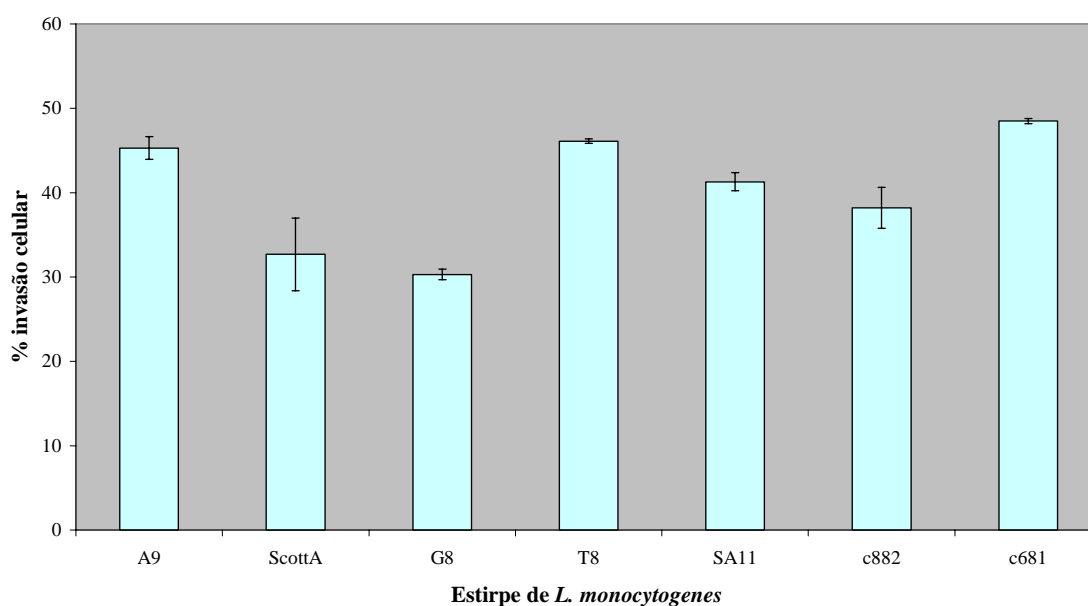


**Figura 7** - Capacidade invasiva (percentagem de invasão) das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo I. As barras verticais correspondem ao desvio padrão (n=9).

A capacidade invasiva das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo I não foi uniforme para este grupo de estirpes, sendo significativamente diferente para um intervalo de confiança de 95% (ver anexo III). Efectuou-se posteriormente uma análise Post-Hoc Tukey ANOVA (programa SPSS Versão 12.0), de forma a comparar as médias de invasão das estirpes analisadas e agrupar as estirpes que são significativamente iguais para um intervalo de confiança de 95% (anexo IV). Foi observado que as estirpes EGD, T58/2 e C897 eram significativamente diferentes de todas as outras, não podendo ser agrupadas. Já as estirpes SLU1922 e CLIP 1.04

apresentam semelhança, sendo significativamente iguais para um valor de 95% confiança.

É possível observar que a percentagem de invasão varia entre os 25 e os 50 %. A estirpe mais invasiva foi a CLIP1.04 com uma percentagem de invasão de  $48,8 \pm 0,5$  % e a estirpe EGD a que apresentou uma menor percentagem de invasão ( $27,1 \pm 1,4$  %).

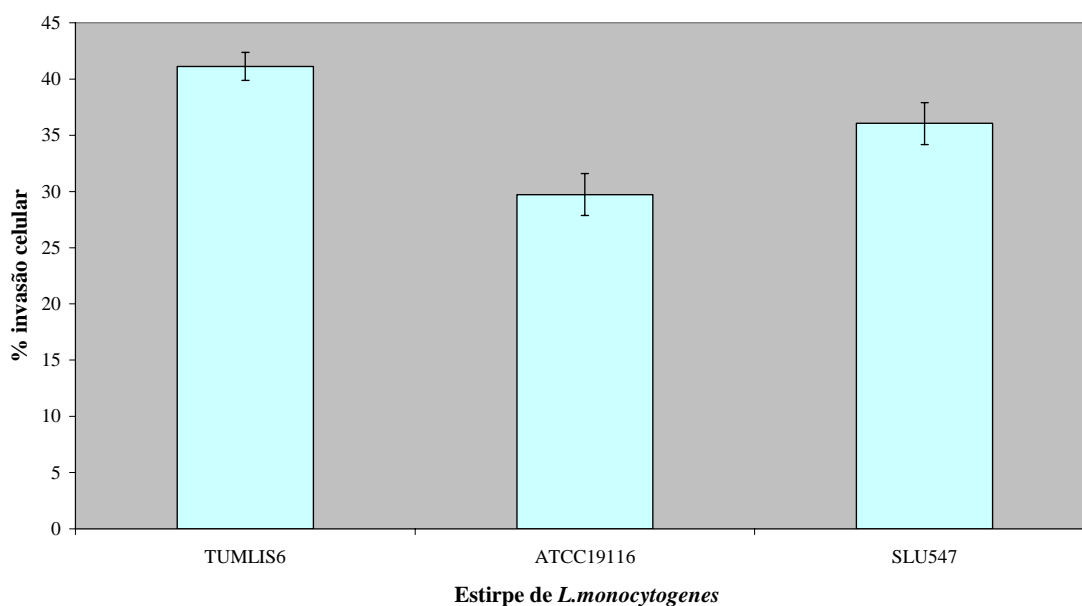


**Figura 8** - Capacidade invasiva (percentagem de invasão) das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo II. As barras verticais correspondem ao desvio padrão (n=9).

Na figura 8 está representada a capacidade de invasão das estirpes *L. monocytogenes* A9, ScottA, G8, T8, SA11, C882 e C681 que pertencem ao genótipo II. Verifica-se que as estirpes apresentam diferentes capacidades de invasão (percentagem de invasão), logo para um intervalo de confiança de 95% considera-se que as estirpes pertencentes ao genótipo II são significativamente diferentes (anexo V). Foi efectuada uma análise Post-Hoc Tukey ANOVA (programa SPSS Versão 12.0), de forma a

comparar as médias das percentagens de invasão apresentadas e agrupar as estirpes que são significativamente iguais para um intervalo de confiança de 95% (anexo VI). Verificou-se que a estirpe G8 não apresentava semelhança significativa com nenhuma das outras estirpes enquanto que as restantes estirpes dividiam-se em dois conjuntos. No primeiro conjunto estavam incluídas as estirpes C882, ScottA e SA11 e o segundo grupo consistia na estirpe A9, T8 e C681.

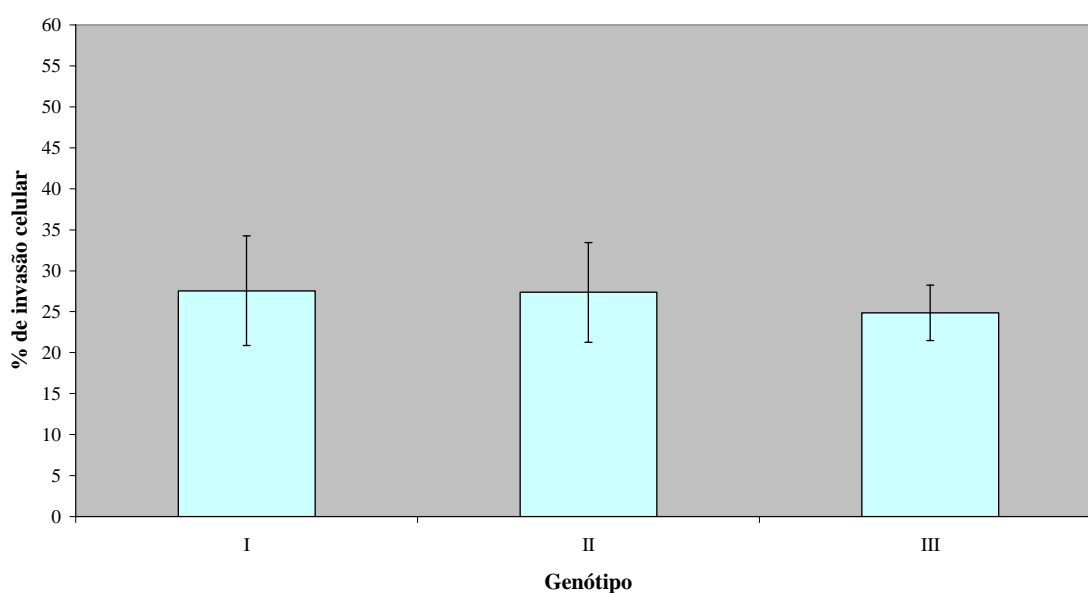
A percentagem de invasão das estirpes deste genótipo varia entre os 30 e os 50 %. A percentagem mais elevada foi atingida pela estirpe C681 ( $48,5 \pm 0,3$  %) e a estirpe G8 foi a que atingiu um menor valor ( $30,3 \pm 0,6$  %)



**Figura 9** - Capacidade invasiva (percentagem de invasão) das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo III. As barras verticais correspondem ao desvio padrão (n=9).

A capacidade de invasão das estirpes *L. monocytogenes* TUM LIS6, ATCC19116 e SLU547 que pertencem ao genótipo III está representada na figura 9. A percentagem

de invasão encontrada para as estirpes deste genótipo foi de  $29,7 \pm 1,9$  % para a estirpe ATCC19116,  $36,0 \pm 1,9$  % para a estirpe SLU547 e  $41,1 \pm 1,2$  % para a estirpe TUMLIS6. Este conjunto de estirpes apresenta capacidade invasiva significativamente diferente para um intervalo de confiança de 95% (anexo VII). Porém, ao se efectuar uma análise Post-Hoc Tukey ANOVA (programa SPSS Versão 12.0), de forma a comparar a variância entre as estirpes analisadas e agrupar as estirpes que são significativamente iguais para um intervalo de confiança de 95% (anexo VIII), foi possível observar que a estirpe ATCC19116 é significativamente igual à estirpe SLU547, já a estirpe TUMLIS6 não apresenta semelhança significativa com nenhuma das outras.



**Figura 10** - Capacidade invasiva média para as estirpes de *L. monocytogenes* de cada genótipo. Valores obtidos com 45 réplicas para o genótipo I, 63 para genótipo II e 27 para genótipo III. As barras verticais correspondem ao desvio padrão de cada conjunto de réplicas.

Ao se analisar a capacidade invasiva média das estirpes por genótipo (figura 10) é possível verificar que a percentagem de invasão das estirpes pertencentes aos

diferentes genótipos é semelhante, atingindo o valor de 27% para o genótipo I e II e 24% para o genótipo III. Esta análise permite observar que para um intervalo de confiança de 95% os três genótipos são significativamente iguais quanto à capacidade invasiva (anexo IX).

Contudo, ao se comparar as médias de invasão apresentadas para cada estirpe através da análise Post-Hoc Tukey ANOVA (programa SPSS Versão 12.0), é possível agrupar as 15 estirpes analisadas em 7 conjuntos de estirpes significativamente iguais (anexo X).

### **3.3- Detecção dos diversos genótipos através da técnica de PCR em tempo real**

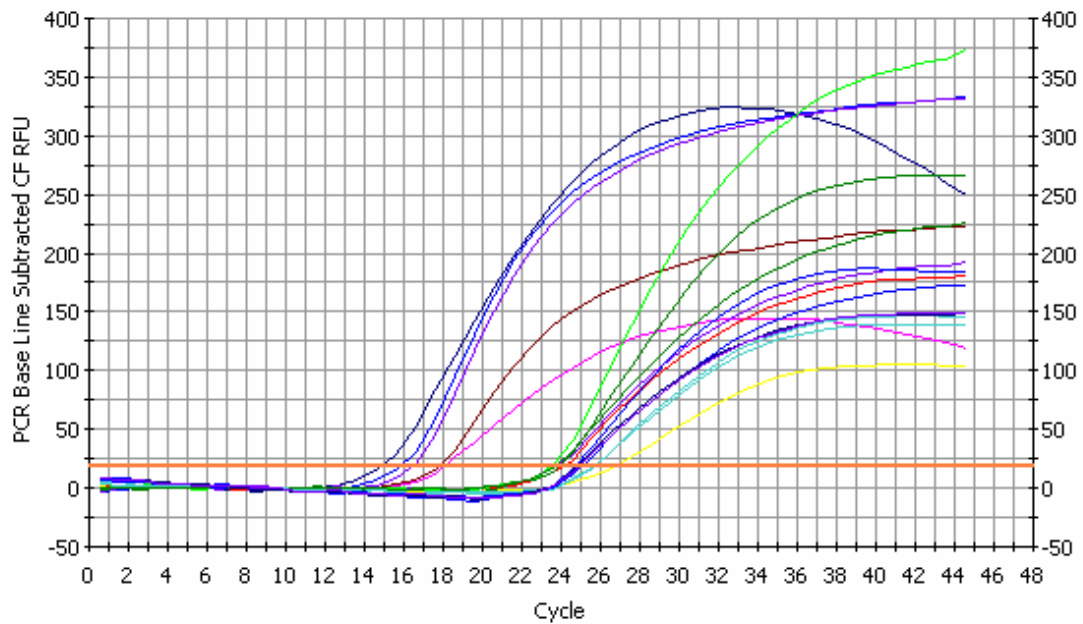
A determinação dos genótipos através da reacção de PCR em tempo real apresenta várias vantagens, nomeadamente a elevada especificidade e a possibilidade de quantificar com precisão o ADN alvo (que é directamente relacionado com o tamanho da população presente na amostra). Outra vantagem consiste no facto desta quantificação ser realizada através da emissão do sinal de fluorescência no decorrer da reacção, assim sendo as manipulações após a reacção são eliminadas o que evita a ocorrência de contaminações cruzadas. Com o propósito de estabelecermos a determinação dos genótipos através de uma reacção de PCR em tempo real utilizou-se a mesma selecção de estirpes representativas dos três tipos de genótipos determinados anteriormente.

### 3.3.1 – Reacção de detecção de estirpes *L. monocytogenes* referentes ao Genótipo I

É fundamental lembrar que as reacções de PCR em tempo real são caracterizadas pelo valor no tempo (ou ciclo de PCR) onde o alvo de amplificação é primeiramente detectado. Este valor é geralmente referido como o ciclo do ponto inicial ( $C_T$ ) ou seja, o ponto no tempo onde a intensidade de fluorescência é maior que a fluorescência de fundo. Consequentemente, quanto maior for a quantidade do ADN alvo, bem como uma elevada especificidade dos *primers*, mais rápido será o aumento do sinal de fluorescência com o surgimento de um valor de  $C_T$  baixo.

Com estas considerações podemos iniciar a avaliação da detecção das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo I.

O valor obtido na reacção de amplificação para as estirpes pertencentes ao genótipo I variou entre 14,9 e 18,1 enquanto que para as estirpes pertencentes ao genótipo II e III assim como que para os controlos negativos foi cerca de 25 (figura 11 e tabela X).



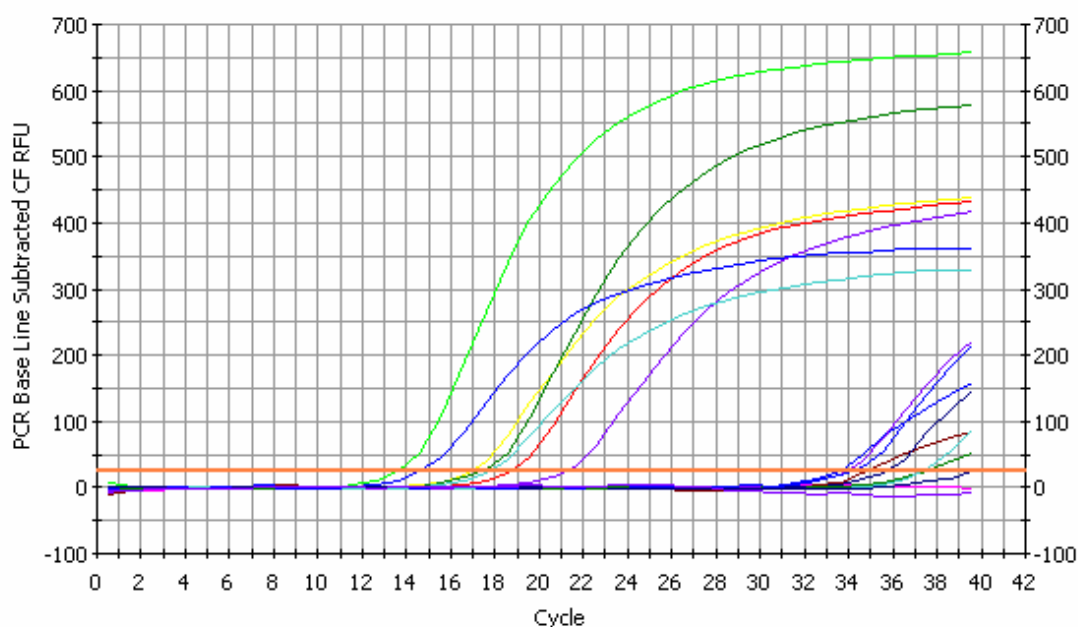
**Figura 11** – Amplificação do ADN das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes aos genótipos I, II e III na reacção de amplificação específica para detecção das estirpes pertencentes ao genótipo I. ● - CLIP1.04 (GI); ● - C897 (GI); ● - SLU 1922 (GI); ● - T58/2 (GI); ● - EGD (GI); ● - T8 (GII); ● - C681 (GII); ● - ScottA (GII); ● - SA11 (GII); ● - C882 (GII); ● - G8 (GII); ● - A9 (GII); ● - TUM LIS6 (GIII); ● - SLU547 (GIII); ● - ATCC19116 (GIII); ● - E.coli; ● - controlo da reacção;

**Tabela X** - Valores de  $C_T$  obtidos nas reacções para a detecção de estirpes pertencentes ao genótipo I. Os resultados são a média de três réplicas  $\pm$  o desvio padrão.

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo</b>	<b><math>C_T \pm dp</math></b>
<b>C897</b>	I	16,8 $\pm$ 1,2
<b>EGD</b>	I	18,2 $\pm$ 0,1
<b>T58/2</b>	I	18,8 $\pm$ 1,4
<b>CLIP 1.04</b>	I	15,6 $\pm$ 0,9
<b>SLU1922</b>	I	17,0 $\pm$ 0,6
<b>A9</b>	II	26,4 $\pm$ 3,5
<b>ScottA</b>	II	26,8 $\pm$ 0,0
<b>G8</b>	II	26,0 $\pm$ 2,6
<b>T8</b>	II	25,8 $\pm$ 3,0
<b>SA11</b>	II	24,4 $\pm$ 0,7
<b>C882</b>	II	27,1 $\pm$ 1,8
<b>C681</b>	II	26,6 $\pm$ 2,5
<b>TUMLIS6</b>	III	24,3 $\pm$ 0,8
<b>ATCC19116</b>	III	27,0 $\pm$ 1,6
<b>SLU547</b>	III	26,1 $\pm$ 1,4
<b><i>E.coli</i></b>	-	27,1 $\pm$ 3,3
<b>Controlo de reacção</b>	-	27,6 $\pm$ 0,6

### 3.3.2– Reacção de detecção de estirpes *L. monocytogenes* referentes ao Genótipo II

A reacção de PCR em tempo real referente à detecção das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes a genótipo II está representada na figura 12. Os valores de  $C_T$  obtidos para as estirpes deste genótipo atingiram os 13,6 e 21,2 ciclos, enquanto os valores de  $C_T$  para as restantes estirpes foi de 33,5 a 37,6 ciclos. Nos controlos negativos os valores de  $C_T$  foram nulos (tabela XI).



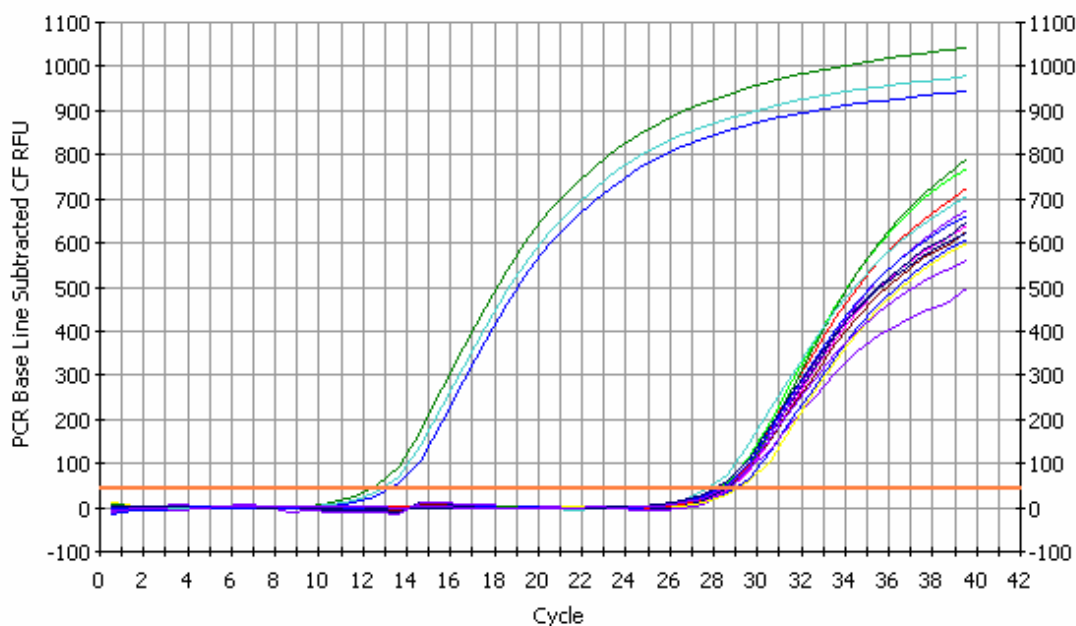
**Figura 12** – Amplificação do ADN das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes aos genótipos I, II e III na reacção de amplificação específica para detecção das estirpes pertencentes ao genótipo II. ● - CLIP1.04 (GI); ● - C897 (GI); ● - SLU 1922 (GI); ● - T58/2 (GI); ● - EGD (GI); ● - T8 (GII); ● - C681 (GII); ● - ScottA (GII); ● - SA11 (GII); ● - C882 (GII); ● - G8 (GII); ● - A9 (GII); ● - TUM LIS6 (GIII); ● - SLU547 (GIII); ● - ATCC19116 (GIII); ● - E.coli; ● - controlo da reacção;

**Tabela XI** - Valores de  $C_T$  obtidos nas reacções para a detecção de estirpes pertencentes ao genótipo II. Os resultados são a média de três réplicas  $\pm$  o desvio padrão.

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo</b>	<b><math>C_T \pm dp</math></b>
<b>C897</b>	I	33.5 $\pm$ 0,0
<b>EGD</b>	I	30.6 $\pm$ 0,0
<b>T58/2</b>	I	34.3 $\pm$ 1,1
<b>CLIP 1.04</b>	I	35.8 $\pm$ 0,0
<b>SLU1922</b>	I	34.0 $\pm$ 0,2
<b>A9</b>	II	18.1 $\pm$ 5,3
<b>ScottA</b>	II	16.9 $\pm$ 0,1
<b>G8</b>	II	18.7 $\pm$ 0,1
<b>T8</b>	II	13.4 $\pm$ 0,4
<b>SA11</b>	II	17.4 $\pm$ 0,1
<b>C882</b>	II	17.7 $\pm$ 0,2
<b>C681</b>	II	14.5 $\pm$ 0,3
<b>TUMLIS6</b>	III	36.1 $\pm$ 2,7
<b>ATCC19116</b>	III	37.4 $\pm$ 0,0
<b>SLU547</b>	III	34.0 $\pm$ 0,4
<b><i>E.coli</i></b>	-	35.2 $\pm$ 0,0
<b>Controlo da reacção</b>	-	N/A

### 3.3.3 – Reacção de detecção de estirpes *L. monocytogenes* referentes ao Genótipo III

A amplificação e detecção da cadeia de ADN correspondente às estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo III estão representadas na figura 13. Os valores de  $C_T$  obtidos para as estirpes do genótipo III foram na ordem dos 13 ciclos. Quanto às estirpes pertencentes aos restantes genótipos, os  $C_T$  observados são superiores, apresentando valores em torno dos 29 ciclos. Valores estes também observados nos dois controlos negativos (tabela XII).



**Figura 13** – Amplificação do ADN das estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes aos genótipos I, II e III na reacção de amplificação específica para detecção das estirpes pertencentes ao genótipo III. ● - CLIP1.04 (GI); ● - C897 (GI); ● - SLU 1922 (GI); ● - T58/2 (GI); ● - EGD (GI); ● - T8 (GII); ● - C681 (GII); ● - ScottA (GII); ● - SA11 (GII); ● - C882 (GII); ● - G8 (GII); ● - A9 (GII); ● - TUM LIS6 (GIII); ● - SLU547 (GIII); ● - ATCC19116 (GIII); ● - E.coli; ● - controlo da reacção;

**Tabela XII** - Valores de  $C_T$  obtidos nas reacções para a detecção de estirpes referentes ao genótipo III. . Os resultados são a média de três réplicas  $\pm$  o desvio padrão.

<b>Estirpe</b>	<b>Genótipo</b>	<b><math>C_T \pm dp</math></b>
<b>C897</b>	I	29,8 $\pm$ 0,9
<b>EGD</b>	I	29,8 $\pm$ 1,0
<b>T58/2</b>	I	29,6 $\pm$ 0,8
<b>CLIP1.04</b>	I	29,5 $\pm$ 1,1
<b>SLU1922</b>	I	29,0 $\pm$ 0,6
<b>A9</b>	II	29,5 $\pm$ 1,0
<b>ScottA</b>	II	29,7 $\pm$ 0,5
<b>G8</b>	II	29,9 $\pm$ 1,4
<b>T8</b>	II	29,5 $\pm$ 1,3
<b>SA11</b>	II	29,4 $\pm$ 0,9
<b>c882</b>	II	29,2 $\pm$ 1,4
<b>C681</b>	II	29,6 $\pm$ 1,3
<b>TUMLIS6</b>	III	12,5 $\pm$ 0,2
<b>ATCC19116</b>	III	13,2 $\pm$ 0,4
<b>SLU547</b>	III	13,2 $\pm$ 0,5
<i>E.coli</i>	-	31 $\pm$ 3,4
<b>Controlo de reacção</b>	-	29 $\pm$ 0,4

### **3.4 – Parâmetros das reacções de detecção dos diferentes genótipos através da técnica de PCR em Tempo Real**

Os parâmetros dos ensaios de PCR em tempo real específicos para cada genótipo foram determinados utilizando uma gama de concentrações de ADN equivalentes a  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$ , 10 e 1 molécula de ADN. A correspondência entre o número de moléculas e a concentração de ADN foi estabelecida através da razão de que uma molécula de ADN equivale a 2,94 fg de ADN (Glaser *et al.*, 2001).

Para cada tipo de reacção de detecção de genótipo foi escolhida uma estirpe a partir da qual se obteve uma quantidade de amostras de diferentes concentrações de ADN.

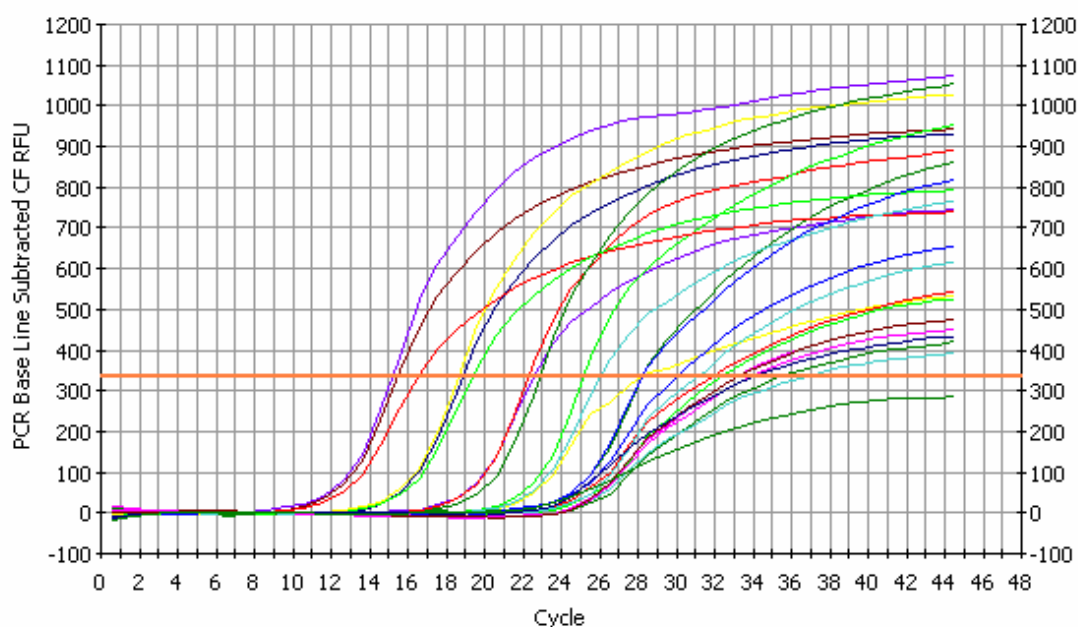
Cada reacção foi assim elaborada em três ensaios independentes e cada concentração de ADN a analisar foi testada em triplicado por ensaio. Foi igualmente incluído um controlo negativo por reacção, controlo este que consistiu na mistura de reacção apenas, sem ADN.

#### **3.4.1- Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao Genótipo I**

Os resultados obtidos na quantificação do ADN de *L. monocytogenes* correspondente ao genótipo I (ADN da estirpe T58/2) utilizando uma gama de concentrações de  $1 \times 10^7$  moléculas de ADN até 1 molécula de ADN são apresentados na tabela XIII e representados na figura 14.

**Tabela XIII** – Número de moléculas de ADN da estirpe *L. monocytogenes* T58/2 representante do genótipo I e o respectivo valor  $C_T$  médio. Os resultados representam a média de três ensaios  $\pm$  o desvio padrão (n=9).

Número aproximado de moléculas de ADN	$C_T \pm dp$
$1 \times 10^7$	$15,3 \pm 0,5$
$1 \times 10^6$	$18,7 \pm 0,4$
$1 \times 10^5$	$22,2 \pm 0,4$
$1 \times 10^4$	$25,6 \pm 1,3$
$1 \times 10^3$	$29,3 \pm 1,7$
$1 \times 10^2$	$30,8 \pm 1,6$
10	$30,8 \pm 2,2$
1	$32 \pm 2,4$



**Figura 14** – Amplificação de diferentes quantidades de ADN referente ao genótipo I (estirpe *L. monocytogenes* T58/2).

É possível observar que para as quantidades mais elevadas de ADN os valores de  $C_T$  apresentam uma variância baixa e à medida que a quantidade de ADN diminui, o valor de desvio-padrão aumenta, o que implica uma maior variância nestes casos. Verifica-se assim que para uma quantidade de ADN de  $1 \times 10^7$ , o valor de  $C_T$  observado é de  $15,3 \pm 0,5$  ciclos. Para a quantidade mais pequena testada, ou seja 1 molécula de ADN, o valor de  $C_T$  obtido foi de  $32 \pm 2,4$  ciclos. Os parâmetros do método foram assim calculados através de uma regressão linear ponderada pelo facto de não haver homogeneidade de variâncias relativamente às diferentes quantidades de ADN testado. A equação foi calculada através do programa Microsoft Office Excel 2003, sendo a recta de regressão dos valores obtidos de  $y = -2,96 x + 36,59$ .

### **Sensibilidade**

A sensibilidade calculada para o método de detecção de estirpes *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo foi de  $-2,96 C_T / \log \text{ADN}$ . Este valor corresponde ao valor ao declive da recta de regressão calculada. Teoricamente a sensibilidade óptima para este método seria de  $3,32 C_T / \log \text{ADN}$  (Higuchi *et al.*, 1993).

### **Limite de detecção e limite de quantificação**

Para o método em questão o sinal mínimo de detecção calculado foi de 25,2 ciclos o que corresponde a um limite de detecção de  $1 \times 10^4$  moléculas de ADN e o limite de quantificação foi de 21 ciclos, valor que corresponde a  $1 \times 10^5$  moléculas de ADN. Estes valores foram determinados através da média calculada com as medições de amostras em branco (Anexo XII).

### **Linearidade e Gama de trabalho**

A Linearidade foi calculada através da norma ISO 8466-1:1990 (anexo XIII) e observa-se que a reacção de detecção de estirpes de *L. monocytogenes* referentes a genótipo I apresenta linearidade (Anexo XIII). Foi igualmente calculado o coeficiente de correlação através do programa Microsoft Office Excel 2003. Este parâmetro consiste numa representação simplificada da linearidade e apresentou um valor de 0,97 o que corresponde a uma correlação perfeita. A gama de trabalho para esta reacção vai de  $1 \times 10^5$ , que corresponde ao limite de quantificação a  $1 \times 10^7$  moléculas de ADN, sendo este o valor mais elevado testado no presente estudo.

### **Especificidade**

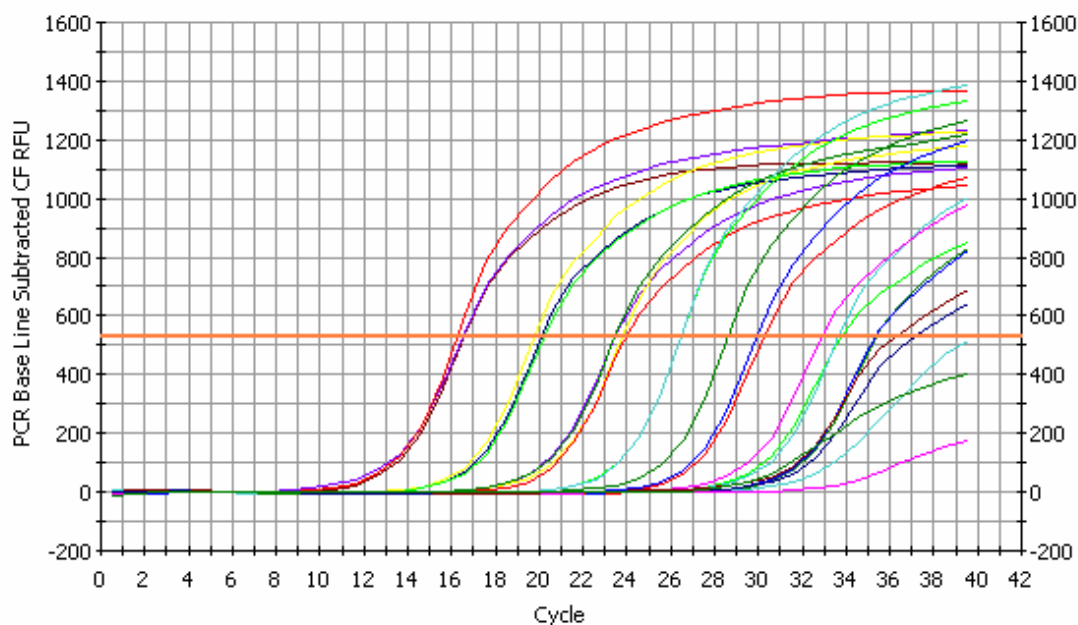
Ao se analisar a figura 11 que demonstra a amplificação de estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes a vários genótipos com primers de detecção de genótipo I. Pode observar-se que a amplificação apenas ocorre abaixo do limite de detecção para as estirpes relativas ao genótipo I. Verifica-se assim que o método é específico para estirpes de genótipo I.

### **3.4.2 - Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo II**

Os resultados obtidos na quantificação do ADN de *L. monocytogenes* correspondente ao genótipo II (ADN da estirpe A9) são apresentados na tabela XIV e representados na figura 15.

**Tabela XIV** – Número de moléculas de ADN da estirpe *L. monocytogenes* A9 representante do genótipo II e o respectivo valor  $C_T$  médio. Os resultados apresentam a média de três ensaios  $\pm$  o desvio padrão (n=9).

<b>Número aproximado de moléculas de ADN</b>	<b><math>C_T \pm dp</math></b>
$1 \times 10^7$	$16,2 \pm 0,3$
$1 \times 10^6$	$19,7 \pm 0,4$
$1 \times 10^5$	$23,2 \pm 0,6$
$1 \times 10^4$	$25,7 \pm 1,0$
$1 \times 10^3$	$29,3 \pm 0,7$
$1 \times 10^2$	$32,8 \pm 0,9$
10	$35,6 \pm 1,0$
1	$35,8 \pm 0,7$



**Figura 15** – Amplificação de diferentes quantidades de ADN referente ao genótipo II (estirpe *L. monocytogenes* A9).

Observa-se assim que as réplicas da mesma concentração de ADN apresentam valores de  $C_T$  semelhantes, com desvio-padrão baixos. Verifica-se que para uma quantidade de ADN de  $1 \times 10^7$ , o valor de  $C_T$  observado foi de  $16,2 \pm 0,3$  ciclos. Para a quantidade mais baixa, ou seja 1 molécula de ADN, o valor de  $C_T$  registado foi de  $35,8 \pm 0,7$  ciclos. Os parâmetros do método foram portanto calculados através de uma regressão linear ponderada pelo facto de não haver homogeneidade de variâncias relativamente às diferentes quantidades de ADN testado (Anexo XIV). A equação foi calculada através do programa Microsoft Office Excel 2003, sendo a recta de regressão dos valores obtidos de  $y = -3,20 x + 38,91$ .

### Sensibilidade

A sensibilidade calculada para o método de detecção de estirpes *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo foi de  $-3,20 C_T / \log \text{ADN}$ . Este valor

corresponde ao valor ao declive da recta de regressão calculada e aproxima-se da sensibilidade óptima que seria de 3,32 C<sub>T</sub>/ log ADN (Higuchi *et al.*, 1993).

### **Limite de detecção e limite de quantificação**

Não foi possível estabelecer os limites de detecção e quantificação para este método, uma vez que os brancos analisados não apresentaram qualquer sinal de amplificação não permitindo assim a determinação do seu valor de C<sub>T</sub>.

### **Linearidade e Gama de trabalho**

Ao se calcular a linearidade para a presente reacção através das especificações da norma ISO 8466-1:1990 (anexo XV), observa-se que esta existe. Foi igualmente calculado o coeficiente de correlação através do programa Microsoft Office Excel 2003. Este consiste numa representação simplificada da linearidade e apresentou um valor de 0,99 o que corresponde a uma correlação perfeita. Para esta reacção não foi possível estabelecer gama de trabalho pois o limite mínimo desta corresponde ao limite de quantificação e este não foi possível de calcular.

### **Especificidade**

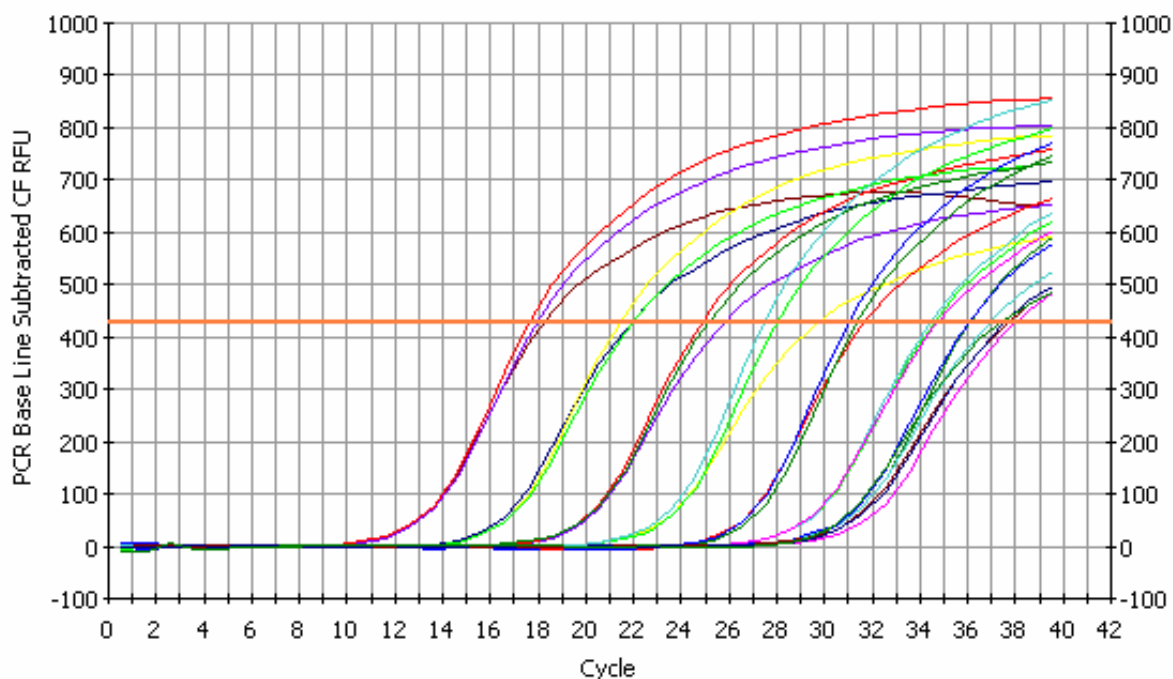
É possível observar na figura 12 que, ao se utilizar *primers* específicos para genótipo II, apenas ocorre amplificação nas estirpes do referido genótipo. Tal resultado demonstra que o método tem elevada especificidade para estirpes de genótipo II quando analisadas juntamente com estirpes de *L. monocytogenes* de outros genótipos e estirpe da espécie *E. coli*.

### 3.4.3 – Parâmetros da reacção de detecção de estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo III

Após se ter procedido à reacção de detecção de estirpes de genótipo III utilizando diferentes concentrações de ADN da estirpe *L. monocytogenes* SLU547, obteve-se a amplificação de ADN representada da figura 16. Na tabela XVI, pode consultar-se a correspondência entre a quantidade de ADN e o valor de  $C_T$  médio (n=9). Os valores de  $C_T$  obtidos variaram de  $18,0 \pm 0,6$  a  $36,6 \pm 1,4$  ciclos.

**Tabela XV** – Número de moléculas de ADN da estirpe *L. monocytogenes* SLU547 representante do genótipo III e o respectivo valor  $C_T$  médio. Os resultados representam a média de três ensaios com três réplicas  $\pm$  o desvio padrão (n=9).

Número aproximado de moléculas de ADN	$C_T$ médio
$1 \times 10^7$	$18,0 \pm 0,6$
$1 \times 10^6$	$21,6 \pm 0,5$
$1 \times 10^5$	$25,1 \pm 0,7$
$1 \times 10^4$	$28,2 \pm 0,9$
$1 \times 10^3$	$31,5 \pm 0,5$
$1 \times 10^2$	$34,3 \pm 0,6$
10	$35,7 \pm 1,2$
1	$36,6 \pm 1,4$



**Figura 16** – Amplificação de diferentes quantidades de ADN referente ao genótipo III (estirpe *L. monocytogenes* SLU547).

Por não se verificar homogeneidade de variâncias em relação às diferentes quantidades de ADN testadas (Anexo XVI), os parâmetros do método foram calculados através de uma regressão linear ponderada. A equação foi calculada através do programa Microsoft Office Excel 2003, sendo a recta de regressão dos valores obtidos de  $y = -3,12 x + 40,39$ .

### Sensibilidade

O valor da sensibilidade corresponde ao declive da recta de regressão calculada. Para o método de detecção de estirpes pertencentes a genótipo III foi de  $-3,12 C_T / \log$  ADN. Este valor aproxima-se da sensibilidade óptima para este tipo de método que seria de  $3,32 C_T / \log$  ADN (Higuchi *et al.*, 1993).

### **Limite de detecção e limite de quantificação**

O valor do limite de detecção e limite de quantificação é obtido a partir da média dos valores  $C_T$  obtidos nas análises das amostras em branco. Para o método em questão, o sinal mínimo de detecção foi 27,7 ciclos, que corresponde a um limite de detecção de  $1 \times 10^4$  moléculas de ADN e o limite de quantificação foi de 24,8 ciclos, que corresponde a  $1 \times 10^5$  moléculas de ADN (Anexo XVII).

### **Linearidade e Gama de trabalho**

Segundo as especificações da norma ISO 8466-1:1990, a presente reacção apresenta linearidade nos resultados obtidos (anexo XVIII). O coeficiente de correlação ( $r^2$ ) que consiste numa representação simplificada da linearidade, foi calculado através do programa Microsoft Office Excel 2003 e apresentou um valor de 0,98 o que corresponde a uma correlação perfeita. A gama de trabalho para esta reacção teve como limite mínimo  $1 \times 10^5$  moléculas de ADN, o que corresponde ao limite mínimo de quantificação e como limite máximo  $1 \times 10^7$  moléculas de ADN, valor este, o mais elevado testado.

### **Especificidade**

Ao se analisar a amplificação com *primers* específicos para genótipo III (figura 13) verifica-se que a mesma apenas ocorre dentro dos limites de detecção e quantificação nas estirpes de *L. monocytogenes* relativas ao genótipo em questão. Tal resultado demonstra que o método é altamente específico para estirpes de genótipo III quando analisadas juntamente com estirpes de *L. monocytogenes* pertencentes aos outros genótipos.



## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 – Determinação do genótipo de *Listeria monocytogenes*

A aplicação do método de Schmid *et al.*, 2003 na determinação dos genótipos do grupo de estirpes *Listeria monocytogenes* demonstrou a especificidade do mesmo, uma vez que não ocorreram falsos positivos apresentando cada estirpe amplificação apenas numa das reacções de detecção (genótipo I, II ou III). Determinou-se porém que a maioria das estirpes pertencia ao genótipo II. Tal resultado pode estar relacionado com o facto de grande parte das estirpes testadas ter origem de queijaria e estas pertencerem maioritariamente ao genótipo II. Após a análise dos dados foi possível estabelecer correspondência entre origem e genótipo em particular para as estirpes provenientes de queijaria, que são na sua maioria genótipo II. As outras origens analisadas, por corresponderem a um número inferior de estirpes, não permitem estabelecer uma relação directa. No estudo de Norton *et al* (2001), em que foi analisado por ribotipagem num grupo de estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de indústrias de fumagem de peixe (n = 117) foi observado que a maioria pertenceu ao genótipo II. É ainda desconhecida a importância desta distribuição de isolados de origem alimentar ou de indústria agro-alimentar. Estudos que permitam a avaliação do genoma destas estirpes, bem como da sua expressão poderão revelar os mecanismos moleculares que levam a que as estirpes se adaptem e prevaleçam neste tipo de ambientes.

## 4.2 – Ensaio de Invasão celular de *L. monocytogenes* em células NIH3T3

Vários tipos de ensaios com linhas celulares foram realizados com a bactéria *L. monocytogenes* de modo a tentar estabelecer relações entre os diversos factores de virulência e a invasão de diferentes linhagens celulares. Entre as células utilizadas encontram-se as células epiteliais (Gailard *et al*, 1987; Mengaud *et al*, 1996; Portnoy *et al*, 1998), os fibroblastos (Kuhn *et al*, 1989, Sun *et al*, 1990) os hepatócitos (Dramsi *et al*, 1995, Gregory *et al*, 1996; Wood *et al*, 1993), as células endoteliais (Drevets *et al*, 1995, Greiffenberg *et al*, 2000; Parida *et al*, 1998) e vários tipos de células nervosas incluindo neurónios (Dramsi *et al*, 1998).

Ensaio de invasão celular em células epiteliais intestinais mostraram a importância do gene *inlA* na invasão das mesmas (Mengaud *et al*, 1996). Estudos mais recentes, utilizando estirpes de *L. monocytogenes* originárias de França que possuíam o gene *inlA* inactivado, mostraram que estas estirpes apresentavam uma capacidade reduzida na invasão da linha celular Caco-2, que corresponde a células epiteliais intestinais (Olier *et al.*, 2005; Olier *et al.*, 2003)

Kuhn *et al.* (1989), demonstraram que a proteína p60 está directamente envolvida na invasão de células mamíferas, NIH3T6, por *L. monocytogenes*, pois verificaram que os mutantes negativos para o gene *iap* não apresentavam capacidade de invasão celular.

Foi com base no facto do gene *iap* estar associado à invasão celular que se realizou o estudo da capacidade invasiva de um grupo de estirpes representativas de cada genótipo em células fibroblastos NIH3T3. Como a definição de genótipo se baseia na sequência do gene *iap* seria de esperar níveis de invasão distintos.

Na secção 3.2 é possível observar os resultados obtidos nos ensaios de invasão celular de células NIH3T3 com um grupo de estirpes *L. monocytogenes* representantes de cada genótipo. Verifica-se que os valores de invasão celular são significativamente diferentes entre as estirpes pertencentes ao mesmo genótipo quando se utiliza um intervalo de confiança de 95%. Porém, ao se comparar a capacidade invasiva média dos três genótipos, observa-se que não existe diferença significativa para o mesmo intervalo de confiança, sendo que os valores apresentados foram de 27% de invasão celular para os genótipos I e II e 24% para o genótipo III.

Foi posteriormente feita uma análise Post-Hoc Tukey ANOVA com os valores de invasão celular de cada estirpe. A referida análise compara as médias entre pares de estirpes e agrupa as que se apresentam significativamente iguais para um intervalo de confiança de 95%. Observou-se com esta análise que é possível constituir vários conjuntos de estirpes significativamente iguais utilizando as estirpes representativas de cada genótipo. Tais resultados não permitem que se relacione o genótipo das estirpes *L. monocytogenes* com a capacidade de invasão celular. A avaliação da citopatogenicidade de isolados de *L. monocytogenes* da indústria de fumagem de peixe, através do teste de placas com células L de ratinho (Norton *et al.*, 2001) revelou uma eficiência de formação de placas semelhante entre estirpes pertencentes a genótipo I e genótipo II. Os resultados do presente estudo em conjunto com os de Norton *et al.*, (2001) levam-nos a equacionar a hipótese de se os mesmos valores seriam obtidos com outro tipo de linha celular, sendo as Caco-2, células endoteliais intestinais, uma possibilidade a testar, bem como estudar a expressão dos genes de virulência nos diversos genótipos em diferentes linhas celulares de modo a esclarecer o seu potencial patogénico.

### 4.3- Detecção dos diversos genótipos através da técnica de PCR em Tempo Real

O método de PCR em tempo real para detecção e quantificação de patógenos em alimentos constitui uma significativa vantagem para a indústria alimentar uma vez que, quando comparado com outros métodos, este apresenta resultados mais rápidos.

Vários métodos de detecção de *Listeria monocytogenes* através da técnica de PCR em tempo real surgiram nos últimos tempos. As reacções multiplex são as mais frequentes assim como o gene *hlyA* o mais utilizado como alvo. Koo & Jaykus (2003) desenvolveram um ensaio de PCR em tempo real multiplex, que amplificava o gene da listeriolisina O (*hlyA*) e da proteína p60 (*iap*). Foi também com base no gene *hlyA* que Nogva *et al.*, (2000) desenharam um método para detectar *L. monocytogenes* em culturas puras de água e leite. Foi com base nos *primers* deste último que foi desenhado um ensaio de PCR em tempo real multiplex para detecção de um gene alvo no patógeno *E. coli* e um gene alvo na bactéria *Listeria monocytogenes* (*hlyA*) (Nguyen *et al.*, 2004). Foi igualmente desenhado um ensaio de PCR em tempo real para detecção simultânea de estirpes de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella*, tendo como alvo o gene *hlyA* nas estirpes de *L. monocytogenes* (Bhagwat *et al.*, 2003)

O gene *iap* juntamente com o *hlyA* foram mais uma vez constituídos alvos num método de detecção de *Listeria monocytogenes*, porém ao contrário dos resultados obtidos pela detecção do gene *hlyA*, o gene *iap* apresenta variabilidade de resultados, sendo estes consistentes apenas quando se tratava de um mesmo serótipo (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2004).

As regiões com alta variabilidade dentro do gene *iap* fazem deste um gene ideal para o desenvolvimento de um método de rotina de detecção dos diferentes genótipos de

*Listeria monocytogenes* no mais diverso tipo de amostras. Neste trabalho, foram desenhados pares de *primers* específicos para cada genótipo cujo alvo consistiu em regiões do gene *iap*.

Ao permitir a quantificação dos ácidos nucleicos, a técnica de PCR em tempo real ultrapassa um dos problemas presentes na técnica PCR. Ao ser de extrema sensibilidade, a técnica de PCR detecta ácidos nucleicos que podem não se encontrar em níveis patogénicos, originando assim falsos positivos. Tal problema é inexistente na técnica de PCR em tempo real uma vez que é possível quantificar os valores obtidos. Outro factor que faz com que a técnica de PCR em tempo real seja uma alternativa atractiva ao PCR convencional para o estudo de carga microbiana consiste na sua baixa variabilidade entre ensaios e dentro de cada ensaio (Locatelli *et al.*, 2000; Abe *et al.*, 1999; Schutten *et al.*, 2000), assim como a sua alta sensibilidade quando comparado com cultura bacteriana ou quando comparado com PCR convencional ou *nested* PCR (Locatelli *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 1993; Monopoeho *et al.*, 2000). A técnica de PCR em tempo real foi considerada uma técnica com sensibilidade comparável ao *Southern blot*, técnica esta considerada por muitos como a técnica de ouro para os ensaios de hibridização (Capone *et al.*, 2001)

É comum encontrar mutações não esperadas nos genomas dos microrganismos, tal facto reduz a eficácia da técnica de PCR. Para evitar possíveis falsos negativos desenhou-se um método altamente específico e rápido, com base na sequência do gene *iap* para distinguir os três genótipos de *L. monocytogenes* através da técnica de PCR em tempo real. O aparecimento de produtos não específicos, assim como falsos positivos foi evitado adicionando à reacção *primers* competidores. Estes *primers* não permitem a amplificação de ADN que não seja alvo, uma vez que não possuem grupo OH no terminal 3'. O método PCR em tempo real competitivo permite assim através de uma

amplificação específica, a distinção de sequências de ADN com alto grau de similaridade. Porém há que ter em conta o facto da concentração de primers competitivos ser crucial no desenvolvimento da reacção. Uma alta concentração dos mesmos leva a uma inibição do emparelhamento específico dos primers, originando um decréscimo de produto obtido (Etokebe *et al.*, 2003). No presente trabalho, foram testadas várias concentrações de primers competitivos de modo a obter os melhores resultados em cada uma das reacções de detecção.

A ocorrência de falsos positivos nas reacções de PCR devido a contaminações consiste num problema considerável na aplicação da técnica num laboratório de diagnóstico molecular. De modo a evitar tais contaminações os ensaios de PCR e PCR em tempo real foram realizados de acordo com a norma QSOP “Good laboratory practice when performing molecular amplification assays”. Todo o material utilizado foi previamente esterilizado, assim como os reagentes foram aliquotados. Respeitou-se o plano de separar fisicamente as diferentes etapas de realização da técnica de PCR de modo a evitar contaminações, sendo que a mistura de reacção foi elaborada numa câmara de fluxo laminar previamente esterilizada. A inclusão de um controlo positivo semelhante ao ADN alvo comprovou a realização correcta da reacção de amplificação. Por outro lado, o facto de não surgir amplificação no controlo negativo revela a não contaminação dos reagentes utilizados. Tais procedimentos garantem a qualidade dos resultados e permitem assim colocar total confiança nos valores obtidos, garantindo inexistência de contaminações, assim como um bom funcionamento dos aparelhos de amplificação.

O valor de  $C_T$  obtido numa reacção de PCR em tempo real, depende da concentração do ácido nucleico presente assim como do tamanho do produto a obter. Quanto maior a concentração de ácido nucleico presente e menor o tamanho do produto,

mais baixo o valor de  $C_T$ . Os pares de *primers* desenhados neste trabalho foram estudados de forma a obter produtos de baixo peso molecular, levando assim a que seja necessário um menor número de ciclos para concretizar a reacção e permitindo desta forma resultados mais rápidos, o que constitui uma vantagem para o método. Outros factores que afectam o valor de  $C_T$  consistem na sensibilidade do aparelho utilizado assim como a sua capacidade para distinguir entre o “ruído” de fundo e a fluorescência específica da amostra. Este último factor leva a que todos os valores correspondentes a ciclos de reacção determinados neste ensaio sejam específicos do mesmo, podendo não ser reproduzível o mesmo valor quando determinado em aparelho diferente.

Para as reacções de detecção dos diferentes genótipos de estirpes *L. monocytogenes* através da técnica de PCR em tempo real foram calculados os diversos parâmetros de modo a caracterizar cada uma das reacções. Como a variância observada nas diversas reacções aplicadas não foi homogénea, sendo que se verificava um aumento da mesma com o decréscimo da quantidade de ADN testada, foi necessário realizar uma regressão linear ponderada de modo a obter uma recta de caracterização de cada método. Este tipo de regressão tem como função dar um maior “peso” aos pontos que têm um menor desvio-padrão na construção da recta, pois é importante que esta passe mais próximo destes pontos do que daqueles que apresentam um erro maior (Miller & Miller, 1993).

As três reacções estudadas apresentaram valores de sensibilidade semelhantes, sendo  $-2,96 C_T / \log \text{ADN}$  para a detecção de estirpes *L. monocytogenes* pertencentes ao genótipo I,  $-3,20 C_T / \log \text{ADN}$  para o genótipo II e  $-3,12 C_T / \log \text{ADN}$  na detecção de estirpes relativas ao genótipo III. Tal como anteriormente referido, estes valores aproximam-se do considerado por Higuchi *et al.*, (1993) para o qual o valor de sensibilidade óptima é de  $3,32 C_T / \log \text{ADN}$ . Tal facto permite afirmar que os diferentes

métodos de detecção de genótipo são métodos sensíveis permitindo assim distinguir duas concentrações de analito muito próximas.

O valor de limite de detecção assim como o valor de limite de quantificação apenas foram possíveis de calcular para as reacções de detecção de genótipo I e III. No caso da reacção de detecção de estirpes relativas ao genótipo II não foi possível obter qualquer valor de detecção em relação às amostras do branco, o que não permitiu o cálculo posterior dos limites de detecção e quantificação do método. Os limites de detecção e quantificação são extremamente importantes pois permitem-nos saber “à priori” qual a gama de concentrações em que podemos trabalhar e também porque permite decidir se um dado sinal instrumental se deve à presença do analito ou é apenas uma flutuação aleatória. Em termos ideais, o método escolhido deve possuir um limite de detecção 1/10 inferior à concentração das amostras analisadas. O limite de detecção é a concentração de analito que origina o sinal mínimo detectável, ou seja o menor sinal que é possível distinguir do ruído de fundo do método (Miller & Miller, 1993). No caso da reacção de detecção de estirpes de genótipo I, o sinal mínimo de detecção calculado foi de 25,2 ciclos o que corresponde a uma quantidade de  $1 \times 10^4$  moléculas de ADN para limite de detecção. Para a reacção de detecção de estirpes de genótipo III, o sinal mínimo de detecção foi 27,7 ciclos, o que corresponde igualmente a um limite de detecção de  $1 \times 10^4$  moléculas de ADN.

O limite de quantificação corresponde à quantidade de analito em que se pode iniciar a reportar valores numéricos. Na reacção de detecção de *L. monocytogenes* de genótipo I, o limite de quantificação foi de 21 ciclos e na reacção de detecção de genótipo III foi de 24,8 ciclos, valores estes que correspondem a  $1 \times 10^5$  moléculas de ADN. Verifica-se assim, que para os métodos de detecção de genótipo I e III os valores

de limite de detecção e quantificação foram idênticos, correspondendo a  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^5$  moléculas de ADN.

Para as reacções em questão foi igualmente calculada a linearidade e a gama de trabalho. A gama de trabalho de um método é a gama de concentrações em que este é aplicável, entre um limite mínimo e um limite máximo. Quando um método usa uma recta de calibração, esta gama também se denomina por gama de linearidade e é a gama em que o sinal instrumental tem um comportamento linear relativamente à concentração do analito. O limite mínimo é geralmente definido como igual ao limite de quantificação enquanto que o limite máximo constitui o limite da linearidade (Miller & Miller, 1993). No presente estudo observou-se que todas as reacções apresentavam linearidade segundo as especificações da norma ISO 8466-1:1990. Foi igualmente calculado o parâmetro de correlação ( $r^2$ ) e verificou-se que este se aproximava do estipulado como perfeito (0,99), apresentando um valor de 0,97 para a reacção de detecção de genótipo I, 0,99 para genótipo II e 0,98 para o genótipo III. A gama de trabalho apenas foi calculada para a reacção de detecção de genótipo I e genótipo III, sendo para ambas as reacções de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  moléculas de ADN. Uma vez que não é conhecido o limite de quantificação para a reacção de detecção de genótipo II, não foi igualmente possível determinar a gama de trabalho.

Outro parâmetro analisado consistiu na especificidade. Por definição, a especificidade de um método é a capacidade do método analisar selectivamente o analito, sem interferências de outras espécies presentes na matriz (Miller & Miller, 1993). Nas reacções em estudo não se quantificou a especificidade, porém, a análise dos resultados obtidos permite-nos afirmar que os métodos em questão são específicos para o analito alvo em relação a estirpes de outros genótipos de *L. monocytogenes* assim

como à espécie *E. coli*, visto a amplificação de ADN de outras estirpes que não as alvo apenas se realizar após o valor do sinal mínimo de detecção (figura 11, 12 e 13).

Existem outros factores a ter em conta quando se planeia um método, tais como robustez, dimensão da amostra, rapidez da análise e equipamento. Neste trabalho não foram focados estes pontos por não se achar adequada a análise para os métodos em questão.

#### 4.4 - Considerações finais

O objectivo do presente estudo, constituído pela determinação dos genótipos do grupo de estirpes isoladas de diversas fontes foi alcançado, quer através da técnica de PCR competitivo, quer pela implementação da técnica de PCR em tempo real. As reacções de detecção de genótipos pela técnica de PCR em tempo real demonstraram especificidade, linearidade e sensibilidade, obtendo-se assim uma metodologia eficaz e apta a utilizar como meio corrente de detecção nos laboratórios de análise.

A citopatogenicidade dos genótipos foi avaliada através de testes de invasão celular, porém não foi possível estabelecer uma ligação entre genótipo e capacidade invasiva. Pelo que a realização de futuros testes moleculares, tais como *microarrays* que possam revelar as características genómicas que melhor diferenciem estes genótipos e ainda a avaliação da expressão genica será fundamental para uma melhor compreensão do funcionamento e da distribuição destes genótipos. A análise da citopatogenicidade utilizando outro tipo de linhas celulares, como Caco-2 poderá auxiliar a diferenciação desta característica entre os diferentes genótipos.

---

## 5- BIBLIOGRAFIA

- ❖ Abe, A., Inoue, K. and Tanaka, T., 1999 Quantification of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 2899-2903.
- ❖ Allerberger, F., Dierich, M., Petranyi, G., Lalic, M. and Bubert, A., 1997. Nonhemolytic strains of *Listeria monocytogenes* detected in milk products using VIDAS immunoassay kit. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. Aug 200(2-3): 189-195.
- ❖ Almeida, G. N., Gibbs, P. A., Hogg, T. A., Teixeira, P. C. 2006. Listeriosis in Portugal: na existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases* 6: 153.
- ❖ Altekruze, S. F., Timbo, B. B., Mowbray, J. C., Bean, N. H. and Potter, M. E., 1998. Cheese-associated outbreaks of human illness in the United States, 1973 to 1992: sanitary manufacturing practices protect consumers. *Journal of Food Prot* 61: 1405-1407.
- ❖ Aureli, P., Fiorucci, G. C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S., 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *The New England Journal of Medicine* 342: 1236-1241.
- ❖ Bansal, N. S., McDonell, F. H., Smith, A., Arnold, G. and Ibrahim, G. F., 1996. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *International Journal of Food Microbiology*. 33: 293-300.
- ❖ Bassler, H.A., Flood, S. J. A., Livak, K. J., Marmaro, J., Knorr, R. and Batt, C. A. 1995. Use of a fluorogenic probe in PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*. 61:3724-3728.

- ❖ Batt, C. A. Rapid methods for detection of *Listeria*. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety, Ryser, E.T. & Marth, E. H. 2<sup>nd</sup> ed. NY 1999: Marcel Dekker, pp 261-278.
- ❖ Beauregard, D. A., Maguire, A. J., Williams, D. H. and Reynolds, P. E., 1997. Semiquantitation of cooperativity in binding of vancomycin-group antibiotics to vancomycin-susceptible and resistant organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41: 2481-2423.
- ❖ Berry, A. M., Lock, R. A., Hansman, D. and Paton, J. C. 1989. Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infeccion and Immunity*. 57: 2324-2330.
- ❖ Bhagwat, A. A., 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 217-224.
- ❖ Bille J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In Miller, A. J., Smith, J. L., Somkuti, G. A. (Eds), *Foodborne Listeriosis*. Elsevier, Amsterdam, pp. 71-74.
- ❖ Boerlin, P., Rocourt, J. and Piffaretti, J.-C. 1991. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol* 41: 59-64.
- ❖ Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimon, P. D. A., Jacquet, C. and Piffaretti, J. C., 1992. *Listeria ivanovii* subsp. Nov. *International Journal Syst. Bacteriology*. 42: 69-73.
- ❖ Bohnert, M., Dilasser, F., Dalet, C., Mengaud, J. and Cossart, P. 1992. Use of specific oligonucleotides for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res. Microbiology* 143:271-280.

- ❖ Brackett, R. E., Beuchat, L. R., Golden, D. A. and Cassiday, P. K. 1990. Assessment of the ability of plating methods to accurately detect *Listeria* in foods. In: A. L. Miller, J. L. Smith, and G. A. Somkuti, eds. Foodborne Listeriosis. New York: Elsevier, 97-103.
- ❖ Bsai, N., and Batt, C.A. 1993. A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. *Molecular. Cell. Probes* 7:199-207
- ❖ Bubert, A., Koehler, S., and W. Goebel. 1992. The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Applied Environmental. Microbiology* .58:2625-2632.
- ❖ Bubert, A., Sokolovic, Z., Chun, S. K., Papatheodorou, L., Simm, A., Goebel, W., 1999. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. *Molecular and General Genetics*. 261: 323-336.
- ❖ Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular. Endocrinology*. .25:169-193.
- ❖ Canvin, J. M. G., Goutcher S. C., Hagig M., Gemmel C. G., and Sturrock R. D., 1997. Persistence of *Staphylococcus aureus* as detected by PCR in the synovial fluid of a patient with septic arthritis. *British Journal of Rheumatol*. **36**:203-206
- ❖ 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. 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*, 2007, 116; 52-63.
- ❖ Clarke, S. C., Reid, J., Thom, L., Denham, B. C., Edwards, G. F. S., 2002. Laboratory confirmation of meningococcal disease in Scotland, *Journal of Clinical Pathology*. 55:32-36.
  - ❖ Cooray, K.J., Nishibori, T., Xiong, H, Matsuyama, T, Fujita, M. and Mitsuyama, M. 1994. Detection of multiple virulence-associated genes of *Listeria monocytogenes* by PCR in artificially contaminated milk samples. *Applied Environmental Microbiology*. 60:3023-3026.
  - ❖ Cox, J. L., Kleis, T., Cordier, J. L., Cordellana, C., Konkell, P., Pedrazzini, C., Beumer, R., Siebenga, A., 1989. *Listeria spp*, in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* 6: 49-61.
  - ❖ Faleiro, M.L. 2000. Tese de doutoramento “Stress response and autolytic behaviour of *Listeria monocytogenes* isolated from Portuguese cheeses”. Univ. Algarve, Faro.
  - ❖ Dalton, C. B., Austin, C. C., Sobel, J., Hayes, P. S., Bibb, W. F., Graves, L. M., Swaminathan, B., Proctor, M. E., and Griffin, P. M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 336:100-105.
  - ❖ Destro, M. T., Leitao, 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.
  - ❖ Donnelly, C. W., 1990. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. P 225-260. In E. T. Ryser and E: H. Marth (ed), *Listeria, Listeriosis and food safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.

- ❖ Donnelly, C. W., 2001. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*. 59: 183-194.
- ❖ Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. and Cossart, P., 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular Microbiology*. 16:251-261.
- ❖ Drevets, D. A., Sawyer, T. A., Potter, T. A. and Campbell, P. A., 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infection and Immunity*. 63: 4268-4276.
- ❖ Duarte, G., Vaz-Velho, m., Capel, C., Gibbs, P., 1999. Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing chains. *International Journal of Food Microbiology*. 52: 163-168.
- ❖ Farber, J.M. and Peterkin P.J. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiology Reviews*. 55:476-511.
- ❖ Fonnesbech-Vogel, B., Huss, H. H., Ojeniyi, B., Ahrens, P., Gram, L., 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2586-2595.
- ❖ Furrer, B., Candrian, U., Hoefelein, C., and Luethy, J. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in-vitro amplification of hemolysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology*. 70:372-379.

- ❖ Gaillard, J. L., Berche, P., Mournier, J., Richard, S. and Sansonetti, P., 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and Immunity*. 55: 2822-2829.
- ❖ Gallagher, L., Ebel, E. D., and Kause, J. R. 2003. Draft FSIS risk assessment for *Listeria* in ready to eat meat and poultry products. Food safety and inspection Service, Washington, D. C.
- ❖ Gentle, A., Anastasopoulos, F. and McBrien, N. A., 2001. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques*. 31: 502-508.
- ❖ Gilot, P., André, P. and Content, J., 1999. *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infection and Immunity*. 67: 6698-6701.
- ❖ Giovanacci, I., Ragimbeau, C., Quenguiner, S., Salvat, G., Vendeuvre, J. L., Carlier, V., Ermel, G., 1999. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. *International Journal of Food Microbiology*. 53: 127-140.
- ❖ Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., Daruva, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurgem T. O., Entian, K. D., Fsihi, H., Portillo, F. G., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-López, N., Hain, T., Huf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., Pablos, B., Pérez-Díaz, J. C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J. and Cossart, P., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849-852.

- ❖ Goebel, W., and Kreft, J., 1997. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends of Microbiology*. 5: 86-88.
- ❖ Goulet, V., Jacquet, C., Vallant, V., Rebière, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot, E., Stainer, F., Rocourt, J., 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet* 345, 1501-1502.
- ❖ Gravani, R. 1999. Incidence and control of *Listeria* in food processing facilities, p. 657-709. In Ryser, E. T. and Marth, E. H. (ed.), *Listeria listeriosis, and food safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, Inc. New York, N. Y.
- ❖ Greiffenberg, L., Goebel, W., Kim, K. S., Daniels, J. and Kuhn, M., 2000. Interaction of *Listeria monocytogenes* with Human Brain Microvascular Endothelial Cells: an Electron Microscopic Study. *Infection and Immunity*. 68: 3275-3279.
- ❖ Greisen, K., Loeffelholz, M., Purohit, A., and Leong, D. 1994. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:335-351.
- ❖ 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.
- ❖ Health protection agency (2006). Good laboratory practice when performing molecular amplification assays. National Standard Method QSOP 38 issue 3.
- ❖ Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and Williams, P. M. 1996. Real Time quantitative PCR. *Genome Res*. 6: 986-994;
- ❖ Hein, I., Klein, D., Lehner, A., Bubert, A., Brandl, E. and Wagner, M. 2001. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbial*. 152: 37-46.

- ❖ Herman, L. M. F., De Ridder, H. F. M. and Vlaemynck, G. M. M., 1995. A multiplex PCR method for the identification of *Listeria spp* and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *Journal of Food Prot.* 58: 867-872.
- ❖ Higuchi, R., Fockler, c., Dollinger, G. and Watson, R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11: 1026-1030.
- ❖ Hodges, J. R. and Kimball, A. M., 2005. The global diet: trade and novel infections. *Global Health.* 22:1-4.
- ❖ Holmes B., Costas M., On S. L. W., Vandamme P., Falsen E. and Kersters K., 1993. *Neisseria weaveri* sp. nov. (formerly CDC group M-5), from dog bite wounds of humans. *International Journal Syst. Bacteriology* 43: 687-693.
- ❖ Hough, A. J., Harbison, S. A., Savill, M. G., Melton, L. D. and Fletcher, G. 2002. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. *Journal of Food Prot.* 65: 1329-1332.
- ❖ [http://mediatheek.thinkquest.nl/~llb054/parse.php?l=nl&f=dutch/s\\_p/ziekteverwekkend/l\\_monocytogenes.html](http://mediatheek.thinkquest.nl/~llb054/parse.php?l=nl&f=dutch/s_p/ziekteverwekkend/l_monocytogenes.html)
- ❖ <http://www.ambion.com/techlib/tn/81/>
- ❖ <http://www.ncifcrf.gov/rtp/gel/rtqpcr/WhatIs.asp,2004>
- ❖ <http://www.bcm.edu/mcfweb/?PMID=3084>
- ❖ International commission on microbiological specification for foods (ICMSF). 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos. Su aplicación a la industria de alimentos. Editorial Acribia S. A. Zaragoza. Espanha. P 332.
- ❖ ISO 8466-1:1990. Water quality-Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. International Organization for Standardization.

- ❖ Johansson, T., Rantala, L., Palmu, L., Honkanen-Buzalski, T., 1999. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *International Journal of Food Microbiology* 47: 111-119.
- ❖ Johnson, W.M., Tyler, S.D., Ewan, E.P., Ashton, F.E., Wang, G. and Rozee, K.R. 1992. Detection of genes coding for listeriolysin and *Listeria monocytogenes* antigen *imaA* in *Listeria* spp. by the polymerase chain reaction. *Microbiology Pathog.* 12:79-86.
- ❖ Klein, D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Molecular Medicin.* 8: 257-260.
- ❖ Klinger, J.D. 1988. Isolation of *Listeria*: a review of procedures and future prospects. *Infection* 16:S98-S105.
- ❖ Kohler, S., Leimeister-Wachter, M., Chakraborty, T., Lottspeich, F., Goebel, W. 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity.* 58:1943-1950.
- ❖ Koo, K. and Jaykus, L. A. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 1082-1088.
- ❖ Kuhn, M., Kathariou, S. and Goebel, W., 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity.* 57:55-61.
- ❖ Kuhn, M., and Goebel, W., 1989. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in the intracellular uptake by mammalian cells. *Infection and Immunity.* 57: 55-61.

- ❖ Kuhn, M and W. Goebel. 1999. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, Ryser, E.T. & Marth, E. H. 2<sup>nd</sup> ed. NY: Marcel Dekker, pp 97-130.
- ❖ Jay, J. M., 1996. Prevalence of *Listeria spp.* on meat and poultry products. *Food Control*. 4/5, 109-214.
- ❖ Lawrence, L. M. and Gilmour, A., 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*. 61: 2139-2141.
- ❖ Lecour, H., Gomes, M., Nogueira, J. A., Marques, R., 1987. Etiology of meningitis in Portugal. *Chemioterapia* 6: 422-423.
- ❖ Linnan, M. J., Mascola, L., Lou, X. D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D. W., Yonekura, M. L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B. D., Fannin, S. L., Kleks, A., Broome, C. V., 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823-828.
- ❖ Locatelli, G., Santoro, F., Veglia, F., Gobbi, A., Lusso, P. and Malnati, M. S. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000. 38: 4042-4048.
- ❖ Makino. S. L., Kawamoto, K., Takeski, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., Igimi, S., 2005. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology* 104: 189-196.
- ❖ Manzano, M., Cocolin, L., Ferroni, P., Gasparini, V., Narduzzi, D., Cantoni, C., and Gomi, G. 1996. Identification of *Listeria* species by a semi-nested polymerase chain reaction. *Res. Microbiology*. 147:637-640.

- ❖ Manzano, M., Cocolin, L., Pipan, C., Falasca, E., Botta, G. A., Cantoni, C. and Comi, G. 1997. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis of *Listeria monocytogenes iap* gene as tool to detect different serogroups. *Molecular Cell. Probes* 11: 459-462.
- ❖ McLauchlin, J., Audurier, A., Frommelt, A., Gerner-Smidt, P., Jacquet, C., Loessner, M.J., Van der Mee-Marquet, N., Rocourt, J., Shah, S. and Wihelms, D. 1996. WHO study on subtyping *Listeria monocytogenes*: results of phage-typing. *International Journal of Food Microbiology*. 32, 289-299.
- ❖ McLauchlin, J., 1997. The patogenicity of *Listeria monocytogenes*: a public health perspective. *Review of Medical Microbiology*. 1: 1-14.
- ❖ 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.
- ❖ Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R. M. and Cossart, P., 1996. E-cadherin is the receptor for internalin a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*. 84: 923-932.
- ❖ Miller, J. C., Miller, J. N., Statistics for analytical chemistry. 3<sup>rd</sup> Ed. Ellis Horwood Limited, 1993.
- ❖ Monopoeho, S., Mignotte, B. and Schwartzbrod, L., 2000. Quantification of enterovirus RNA in sludge samples using single tube real-time RT-PCR. *Biotechniques*. 29:88-93.
- ❖ Mullis, K. B. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annals of Biol. Clinic*. 48 (8): 579-82.

- ❖ Nguyen, L. T., Gillespie, B. E., Nam, H. M., Murinda, S. E. and Oliver, S. P., 2004. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in beef products by real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog Disease*. 1: 231-240.
- ❖ Ninet, B., Banerman, E. and Bille, J., 1992. Assessment of the Accuprobe *Listeria monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 4055-4059.
- ❖ Nogva, H. K., Rudi, K., Naterstad, K., Holck, A. and Lillehaug D. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4266-4271.
- ❖ Norton, D. M., Scarlett, J. M., Horton, K., Sue, D., Thimothe, J., Boor, K. J. and Wiedmann, M. 2001. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 646-653.
- ❖ Novais, C. M., Alves, M. P., 2004. PCR em tempo real. *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 33: 10-13.
- ❖ Olier, M., Pierre, F., Rousseaux, S., Lamaitre, J. P., Rousset, A., Piveteau, P. and Guzzo, J. 2003. Expression of truncated Internalin A is involved in impaired internalization of some *Listeria monocytogenes* isolates carried asymptotically by humans. *Infection and Immunity*. 71: 1217-1224.
- ❖ Olier, M., Garmyn, D., rousseaux, S., Lemaitre, J. P., Piveteau, P., and Guzzo, J., 2005. Truncated internalin A and assymptomatyc *Listeria monocytogenes* carriage: in vivo investigation by allelic exchange. *Infection and Immunity*. 73: 644-648.

- ❖ Parida, S. K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. and Chakraborty, T., 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Molecular Microbiology*. 28: 81-93.
- ❖ Phillips, C. 1998. *Listeria monocytogenes*. P63-68. In Food, bacteria na health. A practical guide. Chandos Publishing Limited, Oxford, England.
- ❖ Pichhi, V., Silva, E. O. T. R., Souza, S. L. P.; Balian, S. C. Isolamento e identificação de *Listeria spp* em quartos dianteiros de bovinos desossados. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v.13, n 63, p. 38-42, 1999.
- ❖ Pierce, M. M., Gibson, R. E., Rodgers, F. G., 1996. Opsonin-independent adherence and phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine peritoneal macrophages. *Journal Medicine Microbiology*. 45: 258-262.
- ❖ Pilgrim, S., Stritzker, J., Schoen, C., Kolb-Maurer, A., Geginat, G., Loessner, M. J., Genschev, I., Goebel, W., 2003. Bactofection of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: improvement and mechanism of DNA delivery. *Gene Therapy*. 10:2036-2045.
- ❖ 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.
- ❖ Portnoy, D. A., Jacks, P. S. and Hinrichs, D. J., 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Experimental Medicine*. 167: 1459-1471.
- ❖ Rasmussen, O. F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L. and Olsen, J.E. 1995. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* 141, 2053-2061.

- ❖ Rasmussen, O. F., Beck, T., Olsen, J. E., Dons, L. and Rossen, L., 1991. *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. *Infection and Immunity*. 59: 3945-3951.
- ❖ Rocourt, J. and Cossart, P., 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Cap. 18. Doyle, M. P., Beauchat, L. R. and Montville, T. J. ASM Press. Washington D.C. USA. 337-352.
- ❖ Rodriguez-Lázaro, D., Hernández, M., Scortii, M., Esteve, T., Vázquez-Boland, J. A., Pla, M. 2004. Quantitative detection of *L. monocytogenes* and *L. innocua* by Real-time PCR: assessment of *hly*, *iap* and *lin02483* targets and ampliFluor technology. *Applied Environmental Microbiology*. 70:1366-1377.
- ❖ Rorvik, L. M., 2000. *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. *International Journal of Food Microbiology*. 62: 183-190.
- ❖ Ruhland, G. J., Hellwing, M., Wanner, G., Fiedler, F., 1993. Cell-surface location of *Listeria*-specific protein p60-detection of *Listeria* cells by indirect immunofluorescence. *Journal Genetic Microbiology*. 139: 609-616.
- ❖ Ryser, E. T. and Marth, E. H., 1991. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. *Marcel Dekker*. Inc., New York. USA.
- ❖ Salvat G., Toquin, M. T., Michel, Y., Colin, P., 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. *International Journal of food Microbiology* 25: 75-81.
- ❖ Schmid, M., Walcher, M., Bubert, A., Wagner, M., Wagner, M., Schleifer, K-H. 2003. Nucleic acid-based, cultivation-independent detection of *Listeria* spp and genotypes of *L. monocytogenes*. *FEMS* 35: 215-225.

- ❖ Schutten, M., van den Hoogen, B., van der Ende, M. E., Gruters, R. A., Osterhaus, A. D. and Niesters, H. G., 2000. Development of a real-time quantitative RT-PCR for the detection of HIV-2 RNA in plasma. *Journal of Virology Methods*. 88: 81-87.
- ❖ Seeliger, H. P.R., Jones, D., 1986. Genus *Listeria*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, ed. Mair P.M.A., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Vol 2), Williams and Wilkins, Baltimore pp 1235-1245.
- ❖ Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K., 2000. InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*. 103: 501-510.
- ❖ Smiatacz, T., Kowalik, M. M., Hlebowicz, M. 2005. Prolonged dysphagia due to *Listeria*-rhombencephalitis with brainstem abcess and acute polyradiculoneuritis. *Journal of Infection* 52: 165-167.
- ❖ Tabouret, M., de Rycke, J. and Dubray, G., 1992. Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, seroval and pathogenicity. *Journal Genetic Microbiology*. 138: 743-753.
- ❖ Tilney, L. t. and Portnoy, D. A., 1989. Actin filaments and the growth, movement and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Biology*. 109: 1597-1608.
- ❖ Tichopad, A., Dilger, M., Schwatz, G. and Pfaffl, M. W., 2003. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 15: 3120:3122.
- ❖ Tilney, L. G. and Portnoy, D. A., 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *Journal Cell Biology*. 109: 1597-1608.

- ❖ Twedet, R. M., Hitchins, A. D. and Prentice, G. A., 1994. Determination of the presence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products: IDF collaborative study. *Journal AOAC*. 77: 395-402.
- ❖ Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, G., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*. 14: 309-318.
- ❖ Vitzthum, F., Greiger, G., Bisswanger, H., Brunner, H. and Bernhagen, J. 1999. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR® Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Annal Biochemistry*. 276(1):59-64.
- ❖ Von Ahsen, N., Schutz, E., Armstrong, V. W. and Oellerich, M. 1999. Rapid detection of prothrombotic mutations of prothrombin (G20210A), factor V (G1691A), and methylenetrahydrofolate reductase (C677T) by real-time fluorescence PCR with the LightCycler. *Clinical Chemistry*. 45:694-696.
- ❖ Wenars, K., Heuvelman, C.J., Chakraborty, T., and Notermans, S.H.W. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Bacteriology*. 70:121-126.
- ❖ Wenger, J. D., Swaminathan, B., Hayes, P. S., Green, S. S., Pratt, M., Pinner, R. W., Schuchat, A., Broome, C. V., 1990. *Listeria monocytogenes* contamination of turkey franks – evaluation of a production facility. *Journal of Food Protection* 53: 1015-1019.
- ❖ Wood, S., N. Maroushek, and C. J. Czuprinski., 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infection and Immunity*. 61:3068-3072

- ❖ Wuenscher, M. D., Kohler, S., Bubert, A., Gerike, U and Goebel, W., 1993. The iap gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal Bacteriology*. 175: 3491-3501.

ANEXO I – SEQUÊNCIA DO GENE *IAP*

1 atgaatatga aaaaagcaac tatcgcggt acagctgggg ttgcggtaac  
 agcatttgct  
 61 gctccaacaa tcgcatccgc aagcactgta gtagtcgaag ctggtgatac  
 tctttggggg  
 121 atgcacaaa gtaaaggac tactgttgac gcaattaaaa aagcaaacaa  
 ttaacaaca  
 181 gataaatct taccaggtca aaaattacaa gtaaatgagg ttgctgctgc  
 tgaaaaaaca  
 241 gagaaatctg ttagcgcaac ttggttaaac gttcgtagtg gcgctgggtg  
 tgataacagt  
 301 attattacgt caatcaaagg cggaacaaaa gtaactgttg aatcaaccga  
 atctaattggc  
 361 tggaacaaaa ttacttaca cgacggggaa actggtttcg ttaacggtaa  
 atacttaact  
 421 gacaaagtag caagcactcc tggtgcacca acacaagaag tgaaaaaaga  
 aactactact  
 481 caacaagctg cacctgctgc agaaacaaaa actgaagtaa aacaaactac  
 acaagcaact  
 541 acacctgcac ctaaagtagc agaaacgaaa gaaactccag tggtagatca  
 aaatgctact  
 601 acacagctg ttaaagcgg tgacactatt tgggctttat ccgtaaaata  
 cggtgtttcc  
 661 gttcaagaca ttatgtcatg gaataattta tcttcttctt ctatttatgt  
 aggtcaaaaa  
 721 cttgctatta aacaacagc caacacagct actccaaaag cagaagtga  
 aaaagaagct  
 781 caagcagctg aaaaacaagc tgcaccagta gttaaagaaa atactaacac  
 taacacaaat  
 841 gctactacag agaaaaaaga aacaacacaa caacaaacag cacctaaagc  
 accaacagaa  
 901 gctgcaaac cagctcccgc accatctaca aacacaaatg ctaataaac  
 gaatacgaat  
 961 acaacaata ctaatacaag tacaccatct aaaaatacca atactaatac  
 aactccaat  
 1021 acgaatacaa actcaaatac gaatgctaat caaggttctt ctaacaataa  
 cagcaattca  
 1081 agtgcgagt ctattattgc tgaagctcaa aaacaccttg gaaaagctta  
 ttcattgggg  
 1141 ggtaacggac caactacatt tgattgctct ggttacacta aatatgtatt  
 tgctaaagcg  
 1201 ggaatctccc ttccacgtac ttctggcgca caatacgtca gcactacaag  
 aatctctgaa  
 1261 tctcaagcaa aacctggtga tttagtatte tttgactatg gtagcgggat  
 ttctcagtt  
 1321 ggtatctacg ttggtaatgg tcaaatgatt aacgcgcaag acaatggcgt  
 tacatacgat  
 1381 aacatccacg gctctggctg gggtaaatat ctagttggct tcggctcgcgt ataa

## ANEXO II – COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO GES E TAMPÃO LISE

### **Tampão GES – Guanidina, EDTA, Sarcosil**

Para 100 ml:

- 60 g Guanidina Tiocianato 5M
- 20 ml EDTA 0,5 M pH 8 (100 mM)
- 5 ml Sarcosil 10% v/v

### **Tampão Lise**

Para 100 ml:

- 1 ml Tris HCl 1M pH9
- 5 ml KCl 1M
- 0,1 ml Triton-X
- 93,9 ml H<sub>2</sub>O

---

## ANEXO III – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INVASÃO CELULAR DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO I

Anova: factor único      genotipo I

### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	8	214,561	26,82012	4,782178
Linha 2	8	83,82478	10,4781	25,09749
Linha 3	9	192,6072	21,4008	13,71442
Linha 4	9	308,0764	34,23071	1,540569
Linha 5	8	231,6299	28,95374	128,5558

### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2713,216428	4	678,3041	20,38623	6,06E-09	2,626052
Dentro de grupos	1231,088493	37	33,27266			
Total	3944,304921	41				

ANEXO IV – ANÁLISE POS-HOC TUKEY ANOVA DOS VALORES  
DE INVASÃO CELULAR DAS ESTIRPES PERTENCENTES A  
GENÓTIPO I

**I – Teste Post Hoc**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: invasão  
Tukey HSD

(I) estirpe	(J) estirpe	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
C897	EGD	16,35000(*)	1,60659	,000	11,7442	20,9558
	T58/2	5,42500(*)	1,56133	,011	,9489	9,9011
	CLIP1.04	-7,40833(*)	1,56133	,000	-11,8844	-2,9323
	SLU1922	-5,33750(*)	1,60659	,016	-9,9433	-,7317
EGD	C897	-16,35000(*)	1,60659	,000	-20,9558	-11,7442
	T58/2	-10,92500(*)	1,56133	,000	-15,4011	-6,4489
	CLIP1.04	-23,75833(*)	1,56133	,000	-28,2344	-19,2823
	SLU1922	-21,68750(*)	1,60659	,000	-26,2933	-17,0817
T58/2	C897	-5,42500(*)	1,56133	,011	-9,9011	-,9489
	EGD	10,92500(*)	1,56133	,000	6,4489	15,4011
	CLIP1.04	-12,83333(*)	1,51471	,000	-17,1758	-8,4909
	SLU1922	-10,76250(*)	1,56133	,000	-15,2386	-6,2864
CLIP1.04	C897	7,40833(*)	1,56133	,000	2,9323	11,8844
	EGD	23,75833(*)	1,56133	,000	19,2823	28,2344
	T58/2	12,83333(*)	1,51471	,000	8,4909	17,1758
	SLU1922	2,07083	1,56133	,677	-2,4052	6,5469
SLU1922	C897	5,33750(*)	1,60659	,016	,7317	9,9433
	EGD	21,68750(*)	1,60659	,000	17,0817	26,2933
	T58/2	10,76250(*)	1,56133	,000	6,2864	15,2386
	CLIP1.04	-2,07083	1,56133	,677	-6,5469	2,4052

\* The mean difference is significant at the .05 level.

**II – Grupos homogêneos**

invasão

Tukey HSD

estirpe	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
EGD	8	10,4750			
T58/2	9		21,4000		
C897	8			26,8250	
SLU1922	8				32,1625
CLIP1.04	9				34,2333

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

Sig.		1,000	1,000	1,000	,682
------	--	-------	-------	-------	------

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,372.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## ANEXO V - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INVASÃO CELULAR DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO II

Anova: factor único

### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	9	284,0096	31,55662	1,985232
Linha 2	8	196,7293	24,59116	23,2066
Linha 3	5	74,63979	14,92796	11,20159
Linha 4	9	285,4618	31,71798	3,12503
Linha 5	9	241,7358	26,85954	4,959984
Linha 6	9	206,3781	22,9309	12,54721
Linha 7	8	270,7132	33,83915	0,992415

### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1678,183698	6	279,6973	35,39225	2,35E-16	2,286436
Dentro de grupos	395,1391435	50	7,902783			
Total	2073,322841	56				

ANEXO VI - ANÁLISE POS-HOC TUKEY ANOVA DOS VALORES  
DE INVASÃO CELULAR DAS ESTIRPES PERTENCENTES A  
GENÓTIPO II

I – Teste Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: invasão

Tukey HSD

(I) estirpe	(J) estirpe	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A9	ScottA	7,41806(*)	1,32601	,000	3,3452	11,4909
	G8	16,63556(*)	1,52212	,000	11,9604	21,3107
	T8	-,16667	1,28642	1,000	-4,1179	3,7845
	SA11	4,70000(*)	1,28642	,010	,7488	8,6512
	C882	8,61111(*)	1,28642	,000	4,6599	12,5623
	C681	-2,29444	1,32601	,600	-6,3673	1,7784
ScottA	A9	-7,41806(*)	1,32601	,000	-11,4909	-3,3452
	G8	9,21750(*)	1,55572	,000	4,4392	13,9958
	T8	-7,58472(*)	1,32601	,000	-11,6575	-3,5119
	SA11	-2,71806	1,32601	,398	-6,7909	1,3548
	C882	1,19306	1,32601	,971	-2,8798	5,2659
	C681	-9,71250(*)	1,36446	,000	-13,9034	-5,5216
G8	A9	-16,63556(*)	1,52212	,000	-21,3107	-11,9604
	ScottA	-9,21750(*)	1,55572	,000	-13,9958	-4,4392
	T8	-16,80222(*)	1,52212	,000	-21,4773	-12,1271
	SA11	-11,93556(*)	1,52212	,000	-16,6107	-7,2604
	C882	-8,02444(*)	1,52212	,000	-12,6996	-3,3493
	C681	-18,93000(*)	1,55572	,000	-23,7083	-14,1517
T8	A9	,16667	1,28642	1,000	-3,7845	4,1179
	ScottA	7,58472(*)	1,32601	,000	3,5119	11,6575
	G8	16,80222(*)	1,52212	,000	12,1271	21,4773
	SA11	4,86667(*)	1,28642	,007	,9155	8,8179
	C882	8,77778(*)	1,28642	,000	4,8266	12,7290
	C681	-2,12778	1,32601	,680	-6,2006	1,9450
SA11	A9	-4,70000(*)	1,28642	,010	-8,6512	-,7488
	ScottA	2,71806	1,32601	,398	-1,3548	6,7909
	G8	11,93556(*)	1,52212	,000	7,2604	16,6107
	T8	-4,86667(*)	1,28642	,007	-8,8179	-,9155
	C882	3,91111	1,28642	,054	-,0401	7,8623
	C681	-6,99444(*)	1,32601	,000	-11,0673	-2,9216
C882	A9	-8,61111(*)	1,28642	,000	-12,5623	-4,6599
	ScottA	-1,19306	1,32601	,971	-5,2659	2,8798
	G8	8,02444(*)	1,52212	,000	3,3493	12,6996
	T8	-8,77778(*)	1,28642	,000	-12,7290	-4,8266
	SA11	-3,91111	1,28642	,054	-7,8623	,0401

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

	C681	-10,90556(*)	1,32601	,000	-14,9784	-6,8327
C681	A9	2,29444	1,32601	,600	-1,7784	6,3673
	ScottA	9,71250(*)	1,36446	,000	5,5216	13,9034
	G8	18,93000(*)	1,55572	,000	14,1517	23,7083
	T8	2,12778	1,32601	,680	-1,9450	6,2006
	SA11	6,99444(*)	1,32601	,000	2,9216	11,0673
	C882	10,90556(*)	1,32601	,000	6,8327	14,9784

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## II – Grupos homogêneos

### invasão

Tukey HSD

estirpe	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
G8	5	14,9200		
C882	9		22,9444	
ScottA	8		24,1375	
SA11	9		26,8556	
A9	9			31,5556
T8	9			31,7222
C681	8			33,8500
Sig.		1,000	,088	,643

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 7,826.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## ANEXO VII - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INVASÃO CELULAR DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO III

Anova: factor único

### SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Linha 1	8	184,5408	23,06759647	7,786034
Linha 2	9	252,0729	28,00809601	2,817625
Linha 3	8	184,5408	23,06759647	7,786034

### ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	140,5932	2	70,29658262	11,75658	0,000336622	3,443356779
Dentro de grupos	131,5455	22	5,979339598			
Total	272,1386	24				

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

ANEXO VIII - ANÁLISE POS-HOC TUKEY ANOVA DOS VALORES  
DE INVASÃO CELULAR DAS ESTIRPES PERTENCENTES A  
GENÓTIPO III

**I – Teste Post Hoc**

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: invasão  
Tukey HSD

(I) estirpe	(J) estirpe	Mean Difference (I- J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
TumLis6	ATCC19116	-4,93750(*)	1,19014	,001	-7,9272	-1,9478
	SLU547	,00000	1,22464	1,000	-3,0764	3,0764
ATCC19116	TumLis6	4,93750(*)	1,19014	,001	1,9478	7,9272
	SLU547	4,93750(*)	1,19014	,001	1,9478	7,9272
SLU547	TumLis6	,00000	1,22464	1,000	-3,0764	3,0764
	ATCC19116	-4,93750(*)	1,19014	,001	-7,9272	-1,9478

\* The mean difference is significant at the .05 level.

**II – Grupos homogêneos**

**invasão**

Tukey HSD

estirpe	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
TumLis6	8	23,0625	
SLU547	8	23,0625	
ATCC19116	9		28,0000
Sig.		1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,308.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

## ANEXO IX - ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA INVASÃO CELULAR DAS ESTIRPES REFERENTES AOS DIFERENTES GENÓTIPOS

Anova: factor único

### SUMÁRIO

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
Coluna 1	42	1030,699	24,54046	96,20256
Coluna 2	57	1559,668	27,36259	37,02362
Coluna 3	25	621,1544	24,84618	11,33911

### ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	227,3273	2	113,6637	2,186616	0,116714076	3,071140457
Dentro de grupos	6289,766	121	51,98154			
Total	6517,094	123				

## ANEXO X - ANÁLISE POS-HOC TUKEY ANOVA DOS VALORES DE INVASÃO CELULAR DAS ESTIRPES PERTENCENTES AOS DIFERENTES GENÓTIPOS

### I – Teste Post Hoc

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: invasão  
Tukey HSD

(I) estirpe	(J) estirpe	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
C897	EGD	16,35000(*)	1,42579	,000	11,4016	21,2984
	T58/2	5,42500(*)	1,38562	,012	,6160	10,2340
	CLIP1.04	-7,40833(*)	1,38562	,000	-12,2173	-2,5993
	SLU1922	-5,33750(*)	1,42579	,022	-10,2859	-,3891
	A9	-4,73056	1,38562	,059	-9,5396	,0784
	ScottA	2,68750	1,42579	,855	-2,2609	7,6359
	G8	11,90500(*)	1,62565	,000	6,2629	17,5471
	T8	-4,89722(*)	1,38562	,042	-9,7062	-,0882

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

EGD	SA11	-,03056	1,38562	1,000	-4,8396	4,7784
	C882	3,88056	1,38562	,263	-,9284	8,6896
	C681	-7,02500(*)	1,42579	,000	-11,9734	-2,0766
	TUMLIS6	3,76250	1,42579	,357	-1,1859	8,7109
	ATCC19116	-1,17500	1,38562	1,000	-5,9840	3,6340
	SLU547	3,76250	1,42579	,357	-1,1859	8,7109
	C897	-16,35000(*)	1,42579	,000	-21,2984	-11,4016
	T58/2	-10,92500(*)	1,38562	,000	-15,7340	-6,1160
	CLIP1.04	-23,75833(*)	1,38562	,000	-28,5673	-18,9493
	SLU1922	-21,68750(*)	1,42579	,000	-26,6359	-16,7391
	A9	-21,08056(*)	1,38562	,000	-25,8896	-16,2716
	ScottA	-13,66250(*)	1,42579	,000	-18,6109	-8,7141
	G8	-4,44500	1,62565	,299	-10,0871	1,1971
	T8	-21,24722(*)	1,38562	,000	-26,0562	-16,4382
	SA11	-16,38056(*)	1,38562	,000	-21,1896	-11,5716
T58/2	C882	-12,46944(*)	1,38562	,000	-17,2784	-7,6604
	C681	-23,37500(*)	1,42579	,000	-28,3234	-18,4266
	TUMLIS6	-12,58750(*)	1,42579	,000	-17,5359	-7,6391
	ATCC19116	-17,52500(*)	1,38562	,000	-22,3340	-12,7160
	SLU547	-12,58750(*)	1,42579	,000	-17,5359	-7,6391
	C897	-5,42500(*)	1,38562	,012	-10,2340	-,6160
	EGD	10,92500(*)	1,38562	,000	6,1160	15,7340
	CLIP1.04	-12,83333(*)	1,34425	,000	-17,4988	-8,1679
	SLU1922	-10,76250(*)	1,38562	,000	-15,5715	-5,9535
	A9	-10,15556(*)	1,34425	,000	-14,8210	-5,4901
	ScottA	-2,73750	1,38562	,808	-7,5465	2,0715
	G8	6,48000(*)	1,59054	,007	,9598	12,0002
	T8	-10,32222(*)	1,34425	,000	-14,9876	-5,6568
	SA11	-5,45556(*)	1,34425	,008	-10,1210	-,7901
	C882	-1,54444	1,34425	,998	-6,2099	3,1210
CLIP1.04	C681	-12,45000(*)	1,38562	,000	-17,2590	-7,6410
	TUMLIS6	-1,66250	1,38562	,997	-6,4715	3,1465
	ATCC19116	-6,60000(*)	1,34425	,000	-11,2654	-1,9346
	SLU547	-1,66250	1,38562	,997	-6,4715	3,1465
	C897	7,40833(*)	1,38562	,000	2,5993	12,2173
	EGD	23,75833(*)	1,38562	,000	18,9493	28,5673
	T58/2	12,83333(*)	1,34425	,000	8,1679	17,4988
	SLU1922	2,07083	1,38562	,975	-2,7382	6,8798
	A9	2,67778	1,34425	,798	-1,9876	7,3432
	ScottA	10,09583(*)	1,38562	,000	5,2868	14,9048
	G8	19,31333(*)	1,59054	,000	13,7931	24,8335
	T8	2,51111	1,34425	,863	-2,1543	7,1765
	SA11	7,37778(*)	1,34425	,000	2,7124	12,0432
	C882	11,28889(*)	1,34425	,000	6,6235	15,9543
	C681	,38333	1,38562	1,000	-4,4257	5,1923
SLU1922	TUMLIS6	11,17083(*)	1,38562	,000	6,3618	15,9798
	ATCC19116	6,23333(*)	1,34425	,001	1,5679	10,8988
	SLU547	11,17083(*)	1,38562	,000	6,3618	15,9798
	C897	5,33750(*)	1,42579	,022	,3891	10,2859
	EGD	21,68750(*)	1,42579	,000	16,7391	26,6359
	T58/2	10,76250(*)	1,38562	,000	5,9535	15,5715
	CLIP1.04	-2,07083	1,38562	,975	-6,8798	2,7382

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

A9	A9	,60694	1,38562	1,000	-4,2021	5,4159
	ScottA	8,02500(*)	1,42579	,000	3,0766	12,9734
	G8	17,24250(*)	1,62565	,000	11,6004	22,8846
	T8	,44028	1,38562	1,000	-4,3687	5,2493
	SA11	5,30694(*)	1,38562	,017	,4979	10,1159
	C882	9,21806(*)	1,38562	,000	4,4091	14,0271
	C681	-1,68750	1,42579	,997	-6,6359	3,2609
	TUMLIS6	9,10000(*)	1,42579	,000	4,1516	14,0484
	ATCC19116	4,16250	1,38562	,169	-,6465	8,9715
	SLU547	9,10000(*)	1,42579	,000	4,1516	14,0484
	C897	4,73056	1,38562	,059	-,0784	9,5396
	EGD	21,08056(*)	1,38562	,000	16,2716	25,8896
	T58/2	10,15556(*)	1,34425	,000	5,4901	14,8210
	CLIP1.04	-2,67778	1,34425	,798	-7,3432	1,9876
ScottA	SLU1922	-,60694	1,38562	1,000	-5,4159	4,2021
	ScottA	7,41806(*)	1,38562	,000	2,6091	12,2271
	G8	16,63556(*)	1,59054	,000	11,1154	22,1558
	T8	-,16667	1,34425	1,000	-4,8321	4,4988
	SA11	4,70000(*)	1,34425	,046	,0346	9,3654
	C882	8,61111(*)	1,34425	,000	3,9457	13,2765
	C681	-2,29444	1,38562	,941	-7,1034	2,5146
	TUMLIS6	8,49306(*)	1,38562	,000	3,6841	13,3021
	ATCC19116	3,55556	1,34425	,353	-1,1099	8,2210
	SLU547	8,49306(*)	1,38562	,000	3,6841	13,3021
	C897	-2,68750	1,42579	,855	-7,6359	2,2609
	EGD	13,66250(*)	1,42579	,000	8,7141	18,6109
	T58/2	2,73750	1,38562	,808	-2,0715	7,5465
	CLIP1.04	-10,09583(*)	1,38562	,000	-14,9048	-5,2868
G8	SLU1922	-8,02500(*)	1,42579	,000	-12,9734	-3,0766
	A9	-7,41806(*)	1,38562	,000	-12,2271	-2,6091
	G8	9,21750(*)	1,62565	,000	3,5754	14,8596
	T8	-7,58472(*)	1,38562	,000	-12,3937	-2,7757
	SA11	-2,71806	1,38562	,816	-7,5271	2,0909
	C882	1,19306	1,38562	1,000	-3,6159	6,0021
	C681	-9,71250(*)	1,42579	,000	-14,6609	-4,7641
	TUMLIS6	1,07500	1,42579	1,000	-3,8734	6,0234
	ATCC19116	-3,86250	1,38562	,269	-8,6715	,9465
	SLU547	1,07500	1,42579	1,000	-3,8734	6,0234
	C897	-11,90500(*)	1,62565	,000	-17,5471	-6,2629
	EGD	4,44500	1,62565	,299	-1,1971	10,0871
	T58/2	-6,48000(*)	1,59054	,007	-12,0002	-,9598
	CLIP1.04	-19,31333(*)	1,59054	,000	-24,8335	-13,7931
SLU1922	-17,24250(*)	1,62565	,000	-22,8846	-11,6004	
A9	A9	-16,63556(*)	1,59054	,000	-22,1558	-11,1154
	ScottA	-9,21750(*)	1,62565	,000	-14,8596	-3,5754
	T8	-16,80222(*)	1,59054	,000	-22,3224	-11,2820
	SA11	-11,93556(*)	1,59054	,000	-17,4558	-6,4154
	C882	-8,02444(*)	1,59054	,000	-13,5446	-2,5042
	C681	-18,93000(*)	1,62565	,000	-24,5721	-13,2879
	TUMLIS6	-8,14250(*)	1,62565	,000	-13,7846	-2,5004
	ATCC19116	-13,08000(*)	1,59054	,000	-18,6002	-7,5598
	SLU547	-8,14250(*)	1,62565	,000	-13,7846	-2,5004

Determinação dos genótipos de *Listeria monocytogenes*  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade

T8	C897	4,89722(*)	1,38562	,042	,0882	9,7062
	EGD	21,24722(*)	1,38562	,000	16,4382	26,0562
	T58/2	10,32222(*)	1,34425	,000	5,6568	14,9876
	CLIP1.04	-2,51111	1,34425	,863	-7,1765	2,1543
	SLU1922	-,44028	1,38562	1,000	-5,2493	4,3687
	A9	,16667	1,34425	1,000	-4,4988	4,8321
	ScottA	7,58472(*)	1,38562	,000	2,7757	12,3937
	G8	16,80222(*)	1,59054	,000	11,2820	22,3224
	SA11	4,86667(*)	1,34425	,032	,2012	9,5321
	C882	8,77778(*)	1,34425	,000	4,1124	13,4432
	C681	-2,12778	1,38562	,968	-6,9368	2,6812
	TUMLIS6	8,65972(*)	1,38562	,000	3,8507	13,4687
	ATCC19116	3,72222	1,34425	,280	-,9432	8,3876
	SLU547	8,65972(*)	1,38562	,000	3,8507	13,4687
	SA11	C897	,03056	1,38562	1,000	-4,7784
EGD		16,38056(*)	1,38562	,000	11,5716	21,1896
T58/2		5,45556(*)	1,34425	,008	,7901	10,1210
CLIP1.04		-7,37778(*)	1,34425	,000	-12,0432	-2,7124
SLU1922		-5,30694(*)	1,38562	,017	-10,1159	-,4979
A9		-4,70000(*)	1,34425	,046	-9,3654	-,0346
ScottA		2,71806	1,38562	,816	-2,0909	7,5271
G8		11,93556(*)	1,59054	,000	6,4154	17,4558
T8		-4,86667(*)	1,34425	,032	-9,5321	-,2012
C882		3,91111	1,34425	,209	-,7543	8,5765
C681		-6,99444(*)	1,38562	,000	-11,8034	-2,1854
TUMLIS6		3,79306	1,38562	,297	-1,0159	8,6021
ATCC19116		-1,14444	1,34425	1,000	-5,8099	3,5210
SLU547		3,79306	1,38562	,297	-1,0159	8,6021
C882		C897	-3,88056	1,38562	,263	-8,6896
	EGD	12,46944(*)	1,38562	,000	7,6604	17,2784
	T58/2	1,54444	1,34425	,998	-3,1210	6,2099
	CLIP1.04	-11,28889(*)	1,34425	,000	-15,9543	-6,6235
	SLU1922	-9,21806(*)	1,38562	,000	-14,0271	-4,4091
	A9	-8,61111(*)	1,34425	,000	-13,2765	-3,9457
	ScottA	-1,19306	1,38562	1,000	-6,0021	3,6159
	G8	8,02444(*)	1,59054	,000	2,5042	13,5446
	T8	-8,77778(*)	1,34425	,000	-13,4432	-4,1124
	SA11	-3,91111	1,34425	,209	-8,5765	,7543
	C681	-10,90556(*)	1,38562	,000	-15,7146	-6,0966
	TUMLIS6	-,11806	1,38562	1,000	-4,9271	4,6909
	ATCC19116	-5,05556(*)	1,34425	,021	-9,7210	-,3901
	SLU547	-,11806	1,38562	1,000	-4,9271	4,6909
	C681	C897	7,02500(*)	1,42579	,000	2,0766
EGD		23,37500(*)	1,42579	,000	18,4266	28,3234
T58/2		12,45000(*)	1,38562	,000	7,6410	17,2590
CLIP1.04		-,38333	1,38562	1,000	-5,1923	4,4257
SLU1922		1,68750	1,42579	,997	-3,2609	6,6359
A9		2,29444	1,38562	,941	-2,5146	7,1034
ScottA		9,71250(*)	1,42579	,000	4,7641	14,6609
G8		18,93000(*)	1,62565	,000	13,2879	24,5721
T8		2,12778	1,38562	,968	-2,6812	6,9368
SA11		6,99444(*)	1,38562	,000	2,1854	11,8034

	C882	10,90556(*)	1,38562	,000	6,0966	15,7146
	TUMLIS6	10,78750(*)	1,42579	,000	5,8391	15,7359
	ATCC19116	5,85000(*)	1,38562	,004	1,0410	10,6590
	SLU547	10,78750(*)	1,42579	,000	5,8391	15,7359
TUMLIS6	C897	-3,76250	1,42579	,357	-8,7109	1,1859
	EGD	12,58750(*)	1,42579	,000	7,6391	17,5359
	T58/2	1,66250	1,38562	,997	-3,1465	6,4715
	CLIP1.04	-11,17083(*)	1,38562	,000	-15,9798	-6,3618
	SLU1922	-9,10000(*)	1,42579	,000	-14,0484	-4,1516
	A9	-8,49306(*)	1,38562	,000	-13,3021	-3,6841
	ScottA	-1,07500	1,42579	1,000	-6,0234	3,8734
	G8	8,14250(*)	1,62565	,000	2,5004	13,7846
	T8	-8,65972(*)	1,38562	,000	-13,4687	-3,8507
	SA11	-3,79306	1,38562	,297	-8,6021	1,0159
	C882	,11806	1,38562	1,000	-4,6909	4,9271
	C681	-10,78750(*)	1,42579	,000	-15,7359	-5,8391
	ATCC19116	-4,93750(*)	1,38562	,038	-9,7465	-,1285
	SLU547	,00000	1,42579	1,000	-4,9484	4,9484
ATCC19116	C897	1,17500	1,38562	1,000	-3,6340	5,9840
	EGD	17,52500(*)	1,38562	,000	12,7160	22,3340
	T58/2	6,60000(*)	1,34425	,000	1,9346	11,2654
	CLIP1.04	-6,23333(*)	1,34425	,001	-10,8988	-1,5679
	SLU1922	-4,16250	1,38562	,169	-8,9715	,6465
	A9	-3,55556	1,34425	,353	-8,2210	1,1099
	ScottA	3,86250	1,38562	,269	-,9465	8,6715
	G8	13,08000(*)	1,59054	,000	7,5598	18,6002
	T8	-3,72222	1,34425	,280	-8,3876	,9432
	SA11	1,14444	1,34425	1,000	-3,5210	5,8099
	C882	5,05556(*)	1,34425	,021	,3901	9,7210
	C681	-5,85000(*)	1,38562	,004	-10,6590	-1,0410
	TUMLIS6	4,93750(*)	1,38562	,038	,1285	9,7465
	SLU547	4,93750(*)	1,38562	,038	,1285	9,7465
SLU547	C897	-3,76250	1,42579	,357	-8,7109	1,1859
	EGD	12,58750(*)	1,42579	,000	7,6391	17,5359
	T58/2	1,66250	1,38562	,997	-3,1465	6,4715
	CLIP1.04	-11,17083(*)	1,38562	,000	-15,9798	-6,3618
	SLU1922	-9,10000(*)	1,42579	,000	-14,0484	-4,1516
	A9	-8,49306(*)	1,38562	,000	-13,3021	-3,6841
	ScottA	-1,07500	1,42579	1,000	-6,0234	3,8734
	G8	8,14250(*)	1,62565	,000	2,5004	13,7846
	T8	-8,65972(*)	1,38562	,000	-13,4687	-3,8507
	SA11	-3,79306	1,38562	,297	-8,6021	1,0159
	C882	,11806	1,38562	1,000	-4,6909	4,9271
	C681	-10,78750(*)	1,42579	,000	-15,7359	-5,8391
	TUMLIS6	,00000	1,42579	1,000	-4,9484	4,9484
	ATCC19116	-4,93750(*)	1,38562	,038	-9,7465	-,1285

\* The mean difference is significant at the .05 level.

## II – Grupos homogêneos

invasão								
estirpe	N	Subset for alpha = .05						
		1	2	3	4	5	6	7
EGD	8	10,4750						
G8	5	14,9200						
T58/2	9		21,4000					
C882	9		22,9444	22,9444				
TUMLIS6	8		23,0625	23,0625				
SLU547	8		23,0625	23,0625				
ScottA	8		24,1375	24,1375	24,1375			
C897	8			26,8250	26,8250	26,8250		
SA11	9			26,8556	26,8556	26,8556		
ATCC19116	9				28,0000	28,0000	28,0000	
A9	9					31,5556	31,5556	31,5556
T8	9					31,7222	31,7222	31,7222
SLU1922	8						32,1625	32,1625
C681	8							33,8500
CLIP1.04	9							34,2333
Sig.		,123	,832	,285	,304	,052	,197	,853

### Tukey HSD

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,096.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

ANEXO XI – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS DIFERENTES  
QUANTIDADES DE ADN TESTADAS NA REACÇÃO DE  
DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO I

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	9	137,9	15,32222222	0,286944444
Linha 2	9	168,7	18,74444444	0,157777778
Linha 3	9	199,6	22,17777778	0,131944444
Linha 4	9	230,3	25,58888889	1,578611111
Linha 5	9	263,8	29,31111111	2,756111111
Linha 6	9	277,4	30,82222222	2,464444444
Linha 7	9	277	30,77777778	4,761944444
Linha 8	9	288,1	32,01111111	5,663611111

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2459,687	7	351,3838095	157,9129861	7,29E-38	2,156423973
Dentro de grupos	142,4111	64	2,225173611			
Total	2602,098	71				

ANEXO XII – LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA  
REACÇÃO DE DETECÇÃO DE ESTIRPES DE *L. MONOCYTOGENES*  
PERTENCENTES AO GENÓTIPO I

**I - Limite de detecção:**

$$LD = B - 3dp$$

$$LD = 25,2 \text{ ciclos.}$$

Em que:

LD – Limite de detecção;

B- Média dos valores medidos para as amostras brancas

Dp – desvio-padrão das amostras brancas

*Determinação dos genótipos de Listeria monocytogenes  
Por PCR em tempo real e avaliação da sua citopatogenicidade*

**II - Limite de quantificação:**

$$LQ = B - 10 dp$$

$$LQ = 21 \text{ ciclos}$$

Em que:

LQ – Limite de quantificação

**ANEXO XIII - CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA A REACÇÃO  
DE DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO I  
ATRAVÉS DAS ESPECIFICAÇÕES DA NORMA ISO 8466-1:1990**

$$DS^2 = (n-2) s^2y^1 - (n-3) s^2y^2$$

$$Ds^2 = (6 \times 0,626959) - 5 \times 0,492425$$

$$Ds^2 = 1,2996$$

$$PG = Ds^2 / s^2y^2$$

$$PG = 2,639$$

PG < FC, logo o método é linear

ANEXO XIV – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS DIFERENTES QUANTIDADES DE ADN TESTADAS NA REACÇÃO DE DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO II

Anova: factor único

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	6	97	16,16667	0,102666667
Linha 2	6	118,3	19,71667	0,149666667
Linha 3	6	139	23,16667	0,314666667
Linha 4	5	130,5	26,1	0,22
Linha 5	6	175,6	29,26667	0,462666667
Linha 6	6	196,6	32,76667	0,866666667
Linha 7	6	213,3	35,55	0,907
Linha 8	2	71,6	35,8	0,5

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1930,029	7	275,7185	626,7685797	7,99669E-35	2,285235
Dentro de grupos	15,39667	35	0,439905			
Total	1945,426	42				

ANEXO XV - CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA A REACÇÃO DE DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO II ATRAVÉS DAS ESPECIFICAÇÕES DA NORMA ISO 8466-1:1990

$$DS^2 = (n-2) s^2y^1 - (n-3) s^2y^2$$

$$Ds^2 = (6 \times 0,183848) - 5 \times 0,093764$$

$$Ds^2 = 0,63427$$

$$PG = Ds^2 / s^2y^2$$

$$PG = 6,7645$$

PG < FC, logo o método é linear.

## ANEXO XVI – ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS DIFERENTES QUANTIDADES DE ADN TESTADAS NA REACÇÃO DE DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO III

Anova: factor único

genIII

### SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Linha 1	9	161,7	17,96667	0,4025
Linha 2	9	194,8	21,64444	0,217777778
Linha 3	9	226,1	25,12222	0,416944444
Linha 4	9	253,6	28,17778	0,744444444
Linha 5	9	283,3	31,47778	0,284444444
Linha 6	9	308,5	34,27778	0,409444444
Linha 7	9	321,3	35,7	1,315
Linha 8	8	292,8	36,6	1,857142857

### ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2891,983	7	413,1404	600,7658321	3,91783E-55	2,158828996
Dentro de grupos	43,32444	63	0,68769			
Total	2935,307	70				

ANEXO XVII – LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA  
REACÇÃO DE DETECÇÃO DE ESTIRPES DE *L. MONOCYTOGENES*  
PERTENCENTES AO GENÓTIPO III

**I - Limite de detecção:**

$$LD = B - 3dp$$

$$LD = 27,7 \text{ ciclos.}$$

Em que:

LD – Limite de detecção;

B- Média dos valores medidos para as amostras brancas

Dp – desvio-padrão das amostras brancas

**II - Limite de quantificação:**

$$LQ = B - 10 dp$$

$$LQ = 24,8 \text{ ciclos}$$

Em que:

LQ – Limite de quantificação

---

ANEXO XVIII - CÁLCULO DA LINEARIDADE PARA A REACÇÃO  
DE DETECÇÃO DE ESTIRPES PERTENCENTES A GENÓTIPO III  
ATRAVÉS DAS ESPECIFICAÇÕES DA NORMA ISO 8466-1:1990

$$DS^2 = (n-2) s^2y^1 - (n-3) s^2y^2$$

$$Ds^2 = (6 \times 0,361323) - 5 \times 0,105479$$

$$Ds^2 = 1,6405$$

$$PG = Ds^2 / s^2y^2$$

$$PG = 15,55$$

PG < FC, logo o método é linear.