

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEc
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo

Samantha Perleberg Vargas

Pelotas, 2015

Samantha Perleberg Vargas

Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador de Estágio: Dr. Marcelo Mendonça

Orientador Acadêmico: Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição

Pelotas, 2015

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

V297a Vargas, Samantha Perleberg

Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo / Samantha Perleberg Vargas. – 44f. : il. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Biotecnologia). Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2015. – Orientador Fabricio Rochedo Conceição.

1.Biotecnologia. 2.*Listeria monocytogenes*. 3.*Listeria innocua*. 4.Anticorpos monoclonais. 5.Listeriose. I.Chaves, Ana Lúcia Soares. II.Título.

CDD: 616.0798

Samantha Perleberg Vargas

Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 11/12/15

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabricio Rochedo Conceição (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Karla Sequeira Mendonça
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

M^a. Neida Lucia Conrad
Mestra em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que me concedeu a vida e sem Ele, não teria chegado até aqui. Por me conceder tranquilidade e paciência nas piores horas.

Aos meus pais, Clóvis e Elisabet, pelo apoio constante, incentivo, carinho, cuidado e por nunca desistirem de mim nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Felipe, pelo imenso companheirismo nos momentos de tristeza, cansaço e também de alegria, e pelo apoio nos momentos em que pensei em desistir.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada e ao Laboratório de Neurobiotecnologia pelo aprendizado, especialmente a Giana e a Suely que tive a oportunidade de acompanhar, pela imensa ajuda e disposição em me explicar e me orientar ao longo do curso.

Ao Marcelo, à Karla e à Neida pela paciência e pelo imenso aprendizado.

À minha família por estarem sempre ao meu lado, me prestando auxílio quando mais precisei, por demonstrarem seu amor e cuidado, me proporcionando paz e refúgio nos momentos de angústia e por tornarem meus dias melhores.

À todos os meus amigos, que oraram por mim e dedicaram um pouco de seu tempo para me ouvir, pelos desabafos, incentivo e também pelos momentos de alegria que puderam me proporcionar que me fizeram perseverar.

À Universidade Federal de Pelotas e ao Núcleo de Biotecnologia do CDTec por oferecerem um curso de qualidade, alta capacitação que são capazes de formar profissionais altamente qualificados.

À FAPERGS e ao CNPq, pela concessão das bolsas de Iniciação Científica.

Muito Obrigada!

*“Ele fortalece ao cansado e dá grande vigor ao que
está sem forças.”*

(Is. 40:29)

Resumo

VARGAS, Samantha Perleberg. **Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo.** 2015. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

O micro-organismo *Listeria* spp. é considerado ubíquo no ambiente que se encontra amplamente disseminado na natureza e, que eventualmente pode contaminar os alimentos, como leite, carnes, peixes e frutos do mar. Este gênero abrange 17 espécies, sendo a *Listeria monocytogenes* patogênica para humanos e animais. Este patógeno é causador da doença alimentar chamada listeriose, a qual causa grande risco à saúde pública, devido ao seu grau de severidade e ao alto índice de mortalidade. O mecanismo de invasão de *L. monocytogenes* é controlado por diversas proteínas produzidas pelo patógeno, como a internalina A (InIA). A detecção deste patógeno é realizada através do cultivo de diferentes meios de enriquecimento seletivos e testes bioquímicos, que são dispendiosos e trabalhosos, bem como testes moleculares e de diagnóstico, como PCR, ELISA e *Western blot*. Os imunoenaios utilizando anticorpos monoclonais (MAbs) para a detecção rápida de *L. monocytogenes* em alimentos têm sido estudados, devido à alta especificidade, reprodutibilidade e seletividade dos MAbs. Nesse sentido, anticorpos monoclonais, MAb-2D12 classe IgG, e o MAb-3F8 classe IgM, específicos contra InIA e FBA (frutose 1, 6- bifosfato aldolase), respectivamente, vêm sendo aplicados no desenvolvimento de ensaios imunológicos de detecção deste patógeno. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão das proteínas FBA e InIA em cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* cultivadas em caldos de enriquecimento não seletivos BHI, TSB-YE e LB, bem como, nos caldos seletivos Fraser, UVM e LEB. Para isso, verificou-se a expressão através de *Western blot* utilizando os MAbs contra as proteínas InIA e FBA e avaliou-se a detecção das cepas de *Listeria* spp. por ELISA. Foi possível observar por *Western blot* que a expressão da proteína InIA foi mais significativa em meio TSB-YE e menos expressiva em meio UVM. Também por *Western blot* verificou-se que a expressão da proteína FBA se mostrou similar entre os meios, apresentando uma menor expressão apenas em meio LEB. Através do ELISA, foi possível observar que as cepas apresentaram valores de absorbância semelhantes quando cultivadas nos meios não seletivos TSB-YE e LB. Quando cultivadas nos meios seletivos, as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram maiores valores de absorbância no meio Fraser, enquanto que as cepas de *L. innocua* demonstraram valores mais significativos no meio LEB. Assim sendo, neste estudo, sugere-se que o LB e o TSB-YE, ambos caldos de enriquecimento não seletivos para *Listeria* spp., sejam os mais adequados para a expressão das proteínas presentes nas cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, anticorpos monoclonais, listeriose.

Abstract

VARGAS, Samantha Perleberg. **Evaluation of the expression of the *Listeria* spp. FBA and InIA proteins in different culture media.** 2015. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

The microorganism *Listeria* spp. is considered ubiquitous in the environment that is widely disseminated in nature and that can eventually contaminate food, such as milk, meat, fish and seafood. This genus comprises 17 species, being *Listeria monocytogenes* pathogenic to humans and animals. It is the pathogen responsible for the foodborne illness listeriosis, which represents a considerable risk to public health due to its severity and high mortality rates. The *L. monocytogenes* mechanism of invasion is controlled by diverse pathogen secreted or surface proteins, like the internalin A (InIA). This pathogen can be detected through different selective enrichment means and biochemical tests, which are costly and laborious, as well as molecular and diagnostic tests, such as PCR, ELISA and *Western blot*. More recently, immunoassays which use monoclonal antibodies (MAbs) for the fast detection of bacteria in food have been studied, due to its high specificity, reproducibility and sensibility. Hence, monoclonal antibodies MAb-2D12 class IgG, and the MAb-3F8 class IgM that are specific against InIA and FBA (fructose 1, 6 biphosphate aldolase), respectively, have been applied in the development of immunologic assays concerning the detection of this pathogen. Thus, the objective of the present work was to evaluate the FBA and InIA proteins expression in *L. monocytogenes* and *L. innocua* strains cultivated in BHI, TSB-YE and LB, non-selective enrichment means, as well as Fraser, UVM and LEB, selective enrichment means. In order to do so, we have verified the expression through *Western blot* using the MAbs against the InIA and FBA proteins, as well as evaluated the detection of the *Listeria* spp. strains through ELISA. It was observed through *Western blot* that the expression of the protein InIA was most significant in TSB-YE and less expressive in UVM media. Also by *Western blot*, it was possible to verify that the expression of FBA protein showed similar between the media, presenting a less significant expression only in LEB media. By ELISA, it was observed that the strains showed similar absorbance values when grown in non-selective TSB-YE and LB media. When grown in selective media, strains of *L. monocytogenes* showed higher absorbance values in the Fraser media, while strains of *L. innocua* showed most significant values in the LEB media. Therefore, in this study, it suggests that LB and TSB-YE, a non-selective enrichments soups for *Listeria* spp., are the most adequate for the expression of the proteins present in the *L. monocytogenes* e *L. innocua* strains.

Keywords: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, monoclonal antibodies, listeriosis.

Lista de Figuras

Figura 1	Avaliação da expressão das proteínas InIA e FBA de <i>Listeria</i> spp. cultivadas nos meios BHI, TSB-YE e LB através de SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	26
Figura 2	Avaliação da expressão das proteínas InIA e FBA de <i>Listeria</i> spp. cultivadas nos meios Fraser, UVM e LEB através de SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	27
Figura 3	ELISA direto e indireto de <i>Listeria</i> spp. em meio de cultivo TSB-YE.....	28
Figura 4	ELISA direto e indireto de <i>Listeria</i> spp. em meio de cultivo LB.....	29
Figura 5	ELISA direto e indireto de <i>Listeria</i> spp. em meio de cultivo Fraser.....	30
Figura 6	ELISA direto e indireto de <i>Listeria</i> spp. em meio de cultivo LEB.....	31

Lista de Abreviaturas e Siglas

BHI - Infusão de Cérebro e Coração

ELISA - Ensaio imunoenzimático

FBA - Frutose 1,6-Bisfosfato Aldolase

InIA - Internalina A

InIB - Internalina B

LB - Luria-Bertani

LEB - Caldo de enriquecimento para *Listeria*

Linn - *Listeria innocua*

Lm - *Listeria monocytogenes*

MAb - Anticorpo monoclonal

OPD - Ortofenilenodiamina

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PBS-T - Solução salina tamponada com fosfato – Tween 20

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sódio

TSB-YE - Caldo de soja tripsinizada acrescido de 0,6% de extrato de levedura

UVM - Caldo de enriquecimento para *Listeria* – Universidade de Vermont

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Objetivos.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
3	Revisão Bibliográfica.....	15
3.1	Características do gênero <i>Listeria</i> spp.....	15
3.2	Listeriose.....	16
3.2.1	Diagnóstico rápido de <i>L. monocytogenes</i>	19
3.3	Anticorpos monoclonais 3F8 e 2D12 e as proteínas FBA e InIA.....	20
3.4	Variação da expressão de proteínas em meios de cultivo.....	21
4	Materiais e métodos.....	22
4.1	Preparo dos meios e cultivos.....	22
4.2	Preparo das amostras para SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	22
4.3	SDS-PAGE.....	23
4.4	<i>Western blot</i>	23
4.5	ELISA indireto.....	23
4.6	ELISA direto.....	24
5	Resultados e Discussão.....	25
5.1	Avaliação da expressão de InIA e FBA através de SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	25
5.2	Avaliação da expressão de InIA e FBA através de ELISA direto e indireto.....	27
6	Conclusões.....	33
7	Perspectivas.....	34
8	Referências.....	35

1 Introdução

Listeria monocytogenes é o patógeno causador da doença alimentar listeriose (ROCOURT et al., 2007). Tal doença apresenta um risco à saúde pública, devido ao seu grau de severidade e ao alto índice de mortalidade (20% a 30%) (SOFOS et al., 2006; CRUZ et al., 2008). A listeriose caracteriza-se por infecções do sistema nervoso central como meningite, além de gastroenterite, aborto e septicemia. Dentre os indivíduos mais suscetíveis, estão pacientes imunocomprometidos, idosos e recém-nascidos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O método tradicional para detecção de *L. monocytogenes* se dá pelo cultivo em diferentes meios de enriquecimento seletivos e testes bioquímicos. Esses são dispendiosos e trabalhosos, podendo levar mais de sete dias para a obtenção do resultado final (GASANOV et al., 2005). Sendo assim, métodos mais rápidos e práticos são alvos de interesse.

Nesse sentido, imunoenaios utilizando anticorpos monoclonais (MAbs) para a detecção rápida de bactérias em alimentos têm como vantagem a alta especificidade, reprodutibilidade e seletividade. No estudo de MENDONÇA (2012), foram obtidos 2 MAbs: o MAb-2D12, anti-InIA (classe IgG) que é capaz de reconhecer apenas espécies patogênicas de *Listeria*, como *L. monocytogenes*; e o MAb-3F8, anti-FBA (classe IgM), que é capaz de reconhecer qualquer espécie do gênero *Listeria*, permitindo avaliar a presença de espécies não patogênicas e patogênicas (MENDONÇA et al., 2012; STOLL et al., 2012). Estes anticorpos foram previamente caracterizados por diferentes técnicas imunológicas, como *Western blot* e ELISA, e apresentam possível aplicação em métodos rápidos de detecção de *Listeria* (MOREIRA, 2013).

No presente trabalho, diferentes meios de enriquecimento foram utilizados para cultivar as bactérias *L. monocytogenes* e *L. innocua*, com o intuito de

estabelecer o meio de cultivo para o qual tais proteínas alvos dos MAbs 2D12 e 3F8, possuam melhores condições de expressões.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliação da expressão das proteínas FBA e InIA de cepas de *Listeria* spp. em diferentes meios de cultivo.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a expressão de proteínas FBA e InIA nas cepas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* através de *Western blot* e ELISA utilizando os MAbs contra as proteínas InIA (MAb-2D12) e FBA (MAb-3F8).

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Características do gênero *Listeria* spp.

As bactérias do gênero *Listeria* spp. foram descritas primeiramente em 1929 como *Bacterium monocytogenes*, devido ao isolamento de micro-organismos que causavam intensa monocitose (CORRÊA & CORRÊA, 1992), sendo mais tarde, em 1940, caracterizadas como *Listeria monocytogenes* (HOFER et al., 2005).

Dezessete espécies do gênero *Listeria* já foram documentadas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* (GRAVES et al., 2010), *L. weihenstephanensis* (HALTER et al., 2013), *L. fleischmannii* (BERTSCH et al., 2013), *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov., *Listeria grandensis* sp. nov. (DEN BAKKER et al., 2014), e *L. booriae* sp. nov. e *L. newyorkensis* sp. nov (WELLER et al., 2015), descobertas no ano de 2015. Dentre essas espécies, apenas *L. monocytogenes* é patogênica para humanos e animais, e *L. ivanovii* apenas para animais (GRAVES et al., 2010).

Membros do gênero *Listeria* possuem extremidades arredondadas, medindo 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2,0 µm de comprimento, sendo geralmente móveis a 20-28° C por meio de um a cinco flagelos peritríquios (ALLERBERGER, 2003), apresentando movimento característico denominado tombamento ou turbilhonamento que auxilia na sua identificação (KASNOWSKI, 2004). Além disso, esses micro-organismos são bastonetes Gram positivos, não produtores de esporo e anaeróbios facultativos (HOFER et al., 2006).

Este gênero de bactéria é capaz de se multiplicar em temperaturas de 2,5°C a 44°C, com temperatura ótima entre 30-37°C, embora existam relatos sobre sua

multiplicação a 0°C, representando significativo perigo para a saúde do consumidor, inclusive quando presente em alimentos mantidos sob refrigeração (SILVA, 2009).

Listeria spp. é um micro-organismo considerado ubíquo, amplamente disseminado na natureza e tem sido isolado do solo, de fezes humanas e de animais, podendo contaminar alimentos como leite e derivados, assim como produtos cárneos, peixes e frutos do mar (SCHWAB et al., 2003). Por isso, esse micro-organismo tem causado crescente preocupação para a indústria alimentícia e para os órgãos de saúde pública (CDC, 2011).

A bactéria *L. monocytogenes* é capaz de aderir às superfícies de equipamentos e utensílios e, posteriormente, formar biofilmes (VON LAER et al., 2009). Sendo assim, capaz de persistir no processamento de alimentos por longos períodos de tempo e contaminar o produto final (VON LAER et al., 2009).

3.2 Listeriose

A listeriose foi descrita há mais de 70 anos por Murray e Pirie (ALLERBERGER, 2003). O primeiro surto de listeriose ocorreu no Canadá em 1981, através do consumo de repolhos (*coleslaw*) adubados com fezes de ovinos contaminados com *L. monocytogenes* (IVANEK; GROHN; WIEDMANN, 2006). O alto risco desta doença está associado ao seu grau de severidade e as taxas de mortalidade, assim como ao longo tempo de incubação (SOFOS et al., 2006; CRUZ et al., 2008).

Além disso, essa doença pode-se apresentar na forma de surtos ou casos esporádicos. De 2005 a 2008 vários surtos foram relatados em países como Suíça, República Checa, Alemanha e Áustria em alimentos como queijo, salsicha e carne de porco, incluindo sintomas como gastroenterite febril (ALLERBERGER et al., 2010). Nos Estados Unidos, *L. monocytogenes* é o terceiro patógeno causador de

morte por ingestão de alimentos contaminados. São registrados anualmente, cerca de 2,5 mil casos de listeriose, sendo que 90% deles levam a hospitalizações e desses, 20% chegam a óbito (CDC, 2011).

No Brasil, ainda não existem relatos de surtos de listeriose associados ao consumo de alimentos contaminados, visto que não há estatísticas oficiais devido à notificação deste patógeno não ser obrigatória (MENDONÇA, 2011). A legislação brasileira vigente estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza a avaliação de *L. monocytogenes* em queijos de média, alta e muito alta umidade (ricota, meia cura e minas) (ANVISA, 2009). Visto isso, casos isolados e surtos de listeriose no Brasil são subdiagnosticados e subnotificados pelo sistema de vigilância pouco eficaz (MENDONÇA, 2011; CRUZ et al., 2008).

Listeria monocytogenes acomete populações de risco, como pacientes imunocomprometidos, idosos, pacientes que recebem agentes imunossupressores, pacientes com AIDS ou com câncer. Essa causa duas formas de listeriose: a listeriose gastrointestinal não-invasiva – a qual se desenvolve como uma gastroenterite febril típica em indivíduos imunocompetentes e, a listeriose invasiva – que se manifesta como septicemia ou meningoencefalite em adultos imunocomprometidos (ALLERBERGER et al., 2010). Além disso, é um agente patogênico multissistêmico que pode infectar uma quantidade numerosa de tecidos do hospedeiro, como indicado pela sua capacidade para causar septicemia envolvendo múltiplos órgãos e com a diversidade de potenciais locais de infecção localizada (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Infecções do sistema nervoso central como meningite e meningoencefalite e outras complicações como aborto e septicemia são as manifestações mais graves da doença (COSSART, 2007). As mulheres grávidas infectadas podem apresentar sintomas brandos como de um resfriado, entretanto, o patógeno pode ultrapassar a

barreira transplacentária e infectar o feto causando aborto, parto prematuro ou, o nascimento de uma criança com meningite (SCHWAB et al., 2003).

O mecanismo de ação da *L. monocytogenes* é controlado por diversas proteínas secretadas ou de superfície do patógeno (RAENGPRADUB et al., 2008; TROST et al., 2005). Dentre essas, a internalina A (InIA), uma adesina necessária para a invasão celular (POYART et al., 1996), possui regiões que interagem covalentemente com a parede celular bacteriana e apresenta porções que permitem a interação com componentes celulares do hospedeiro (MENGAUD et al., 1996; PIZARRO-CERDÁ et al., 2007). Enquanto que a internalina B (InIB), considerada a segunda invasina mais importante de *L. monocytogenes*, não é covalentemente associada à parede celular (PENTECOST et al., 2010; MOREIRA, 2013). Tanto a InIA, quanto a InIB, destacam-se por promoverem a adesão e posterior invasão da bactéria nos enterócitos (WERBROUCK et al., 2006; PENTECOST et al., 2010).

A etapa inicial de colonização do tecido hospedeiro por *L. monocytogenes* é rápida e seu período de incubação longo, envolvendo assim uma fase subclínica e silenciosa (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Após a ingestão de alimentos contaminados, há o desenvolvimento de uma infecção sistêmica sintomática, onde a *L. monocytogenes* entra no hospedeiro humano através do intestino (SCHLECH et al., 1983; DALTON et al., 1997). Ela é capaz de infectar macrófagos e outras células do organismo, sendo esta invasão mediada pelas proteínas InIA e InIB (SHEEHAN et al., 1994). A bactéria lisa o vacúolo fagosomal e é liberada para o citoplasma, onde se espalha em células adjacentes por mediar a montagem de actina (PRON et al., 2001). Além disso, as células dendríticas são os principais alvos celulares de *L. monocytogenes* em placas de Peyer, estando possivelmente envolvidas na disseminação precoce deste patógeno, através do transporte deste para os nódulos linfáticos mesentéricos (PRON et al., 2001).

3.2.1 Diagnóstico rápido de *L. monocytogenes*

O método tradicional para detecção da *L. monocytogenes* se dá pela utilização de diferentes meios de enriquecimento seletivos e testes bioquímicos, que são dispendiosos e trabalhosos, podendo levar mais de 7 dias para a obtenção do resultado final (GASANOV et al., 2005). Por esse motivo, é necessário melhorar as técnicas de detecção de *L. monocytogenes* (ZITZ, 2011). Nesse sentido, imunoenaios utilizando anticorpos monoclonais (MAbs) para a detecção rápida de bactérias em alimentos têm como vantagem a alta especificidade, reprodutibilidade e seletividade (MENDONÇA, 2011).

Em vista disso, anticorpos monoclonais (MAbs) específicos contra InIA e FBA foram produzidos previamente no Laboratório de Imunologia Aplicada do Núcleo de Biotecnologia da UFPel, e vêm sendo aplicados no desenvolvimento de ensaios imunológicos de detecção deste patógeno (MENDONÇA et al., 2012; STOLL et al., 2012). O MAb anti-InIA (classe IgG) 2D12, capaz de reconhecer apenas espécies patogênicas e o MAb (classe IgM) 3F8, capaz de reconhecer qualquer espécie do gênero *Listeria*, permitem avaliar tanto a presença de espécies patogênicas quanto não patogênicas. Estes anticorpos foram caracterizados por meio de técnicas como *Western blot*, e apresentam possibilidade para aplicação em métodos rápidos de detecção de *Listeria* (MOREIRA, 2013).

Outras técnicas, como PCR em tempo real, podem ser aplicadas para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos. Há a disponibilidade de diferentes testes específicos comerciais, como InSite *Listeria* Test (Environmental *Listeria* Species Test), RapidChek® para *Listeria* spp. e Oxoid *Listeria* Rapid Test (JANZTEN et al., 2006; AGOSTINI et al., 2012). Porém, estes são importados, apresentam insumos onerosos e, portanto, apresentam alto custo. Além destes, testes sensíveis e específicos, como ELISA, também podem ser utilizados, devido ao seu baixo

custo, rapidez, simplicidade, por possuírem insumos estáveis e permitir a análise de várias amostras ao mesmo tempo (VIDAL, 2005), podendo os MAbs serem incorporados na elaboração destes testes.

3.3 Anticorpos monoclonais 3F8 e 2D12 e as proteínas FBA e InIA

Os anticorpos monoclonais 3F8 (anti-FBA) e 2D12 (anti-InIA) foram previamente produzidos no laboratório de Imunologia Aplicada do Núcleo de Biotecnologia da UFPel por MENDONÇA (2011). Para a obtenção dos MAbs, o grupo de pesquisa realizou a hiperimunização de camundongos BALB/c com a proteína recombinante InIA (rInIA), juntamente com a bactéria *L. monocytogenes* inativada por fervura, totalizando 10 imunizações. Então, os esplenócitos destes camundongos foram fusionados com células de mieloma Sp2/O na presença de polietilenoglicol (PEG). O screening dos hibridomas foi realizado por ELISA indireto usando a rInIA ou *L. monocytogenes* viáveis, como antígeno. Desta forma, foi possível isolar MAbs que reagem tanto com a proteína InIA, quanto com outros alvos de superfície de *L. monocytogenes*. Após melhor caracterização dos MAbs, o MAb-2D12 demonstrou afinidade pela proteína InIA nativa de *L. monocytogenes*, e o MAb-3F8 à proteína FBA (frutose 1, 6- bifosfato aldolase), presente em todas as bactérias do gênero *Listeria* (MENDONÇA et al., 2011).

A proteína InIA está envolvida no processo de infecção de *L. monocytogenes* e é expressa em todas as fases de crescimento. A proteína FBA participa da rota metabólica de bactérias, entretanto, também está presente na superfície da bactéria (MENDONÇA, 2011). Desta forma, os anticorpos monoclonais contra FBA de *Listeria* spp. (MAb-3F8) e contra InIA de *L. monocytogenes* (MAb-2D12), vêm sendo utilizados em diferentes ensaios imunológicos e possuem alto potencial para a

aplicação e desenvolvimento de testes de diagnóstico rápidos deste gênero bacteriano em alimentos (MENDONÇA et al., 2012).

3.4 Variação da expressão de proteínas em meios de cultivo

Uma grande variabilidade na detecção de espécies de *Listeria* por anticorpos monoclonais pode ser observada em função do meio de cultura utilizado para o enriquecimento das células deste gênero (NANNAPANENI et al., 1998). Além disso, diversas proteínas de *L. monocytogenes* são expressas na superfície das células, tanto em caldos de enriquecimento não seletivos como em seletivos (GENG et al. 2006).

Estudos sobre os efeitos de meios de enriquecimento seletivos e não seletivos, diferentes temperaturas e pHs sobre a expressão de InIA ainda são necessários. Em vista disso, SILVA (2011), avaliou a expressão da proteína InIA de *L. monocytogenes* sob diferentes condições de crescimento e observou que em diferentes condições de cultivo, os meios interferem diretamente na expressão do fator de virulência InIA de *L. monocytogenes*.

A determinação das condições ideais para maior expressão da InIA por *L. monocytogenes* e de FBA por outras bactérias de *Listeria* spp., pode aumentar a sensibilidade e a especificidade de métodos imunológicos de detecção desse patógeno em alimentos, baseados na detecção desses antígenos.

4 Materiais e métodos

4.1 Preparo dos meios e cultivos

As cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* SP8 e *L. innocua* CLIP 12612, presentes na bacterioteca do Laboratório de Imunologia Aplicada, foram repicadas em meio TSA e cultivadas a 37°C por 18h. Aproximadamente 2 UFC/g foram inoculadas em 25 mL dos meios não seletivos BHI (Brain Heart Infusion), LB (Luria-Bertani) e TSB-YE (Trypticase Soy Broth – Yeast Extract 0,6 %) e dos caldos para enriquecimento seletivo de *Listeria* spp.: Fraser, UVM (Listeria Enrichment Broth - University of Vermont Medium) e LEB (Listeria Enrichment Broth). Os cultivos foram incubados a 37°C por 18 h.

4.2 Preparo das amostras para SDS-PAGE e Western blot

Os cultivos foram centrifugados por 10 minutos, 7000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 1 ml de PBS 1X e transferido para um tubo de microcentrífuga, onde foi centrifugado novamente por 5 minutos, 7000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspense em 100 µl de *Sample Solvent* 2X (4.6% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0,124 M Tris, 20% glicerol; pH 6.9). Posteriormente, as amostras foram sonicadas três vezes por 15 segundos para que ocorresse a lise das células. Vinte e cinco µl foram retirados e transferidos para um tubo de microcentrífuga, onde 25 µl de *Sample Solvent* e 5 µl de azul de bromofenol foram adicionados. Após, as amostras foram aquecidas por 10 minutos a 95°C em um termociclador para que ocorresse a desnaturação das proteínas.

4.3 SDS-PAGE

Após o preparo, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%). Após padronização, para as amostras cultivadas em caldos Fraser, UVM, LEB e LB foram aplicados 15 μ L em cada cavidade e para as cultivadas nos meios BHI e TSB-YE foram aplicados 12 μ L. Para as proteínas recombinantes InIA (~1,2 mg/mL) e FBA (~0,7 mg/mL), utilizadas como controles, foram aplicados 5 e 3 μ L, respectivamente. A eletroforese foi realizada a 120 V por aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

4.4 *Western blot*

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida, ocorreu a transferência durante 1 hora a 100 V das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose. O bloqueio da membrana foi realizado com 5% de leite em pó durante 1 h em mesa agitadora. Em seguida, os MAbs marcados com peroxidase, MAb 3F8 (1:200) e MAb 2D12 (1:500) diluídos em 10 ml de PBS-T, foram adicionados, à membrana e deixados sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Para retirar o excesso de conjugado, a membrana foi lavada com PBS-T por mais 1 h. A revelação foi realizada através de quimioluminescência (STOLL et al., 2014).

4.5 ELISA indireto

Foram realizados cultivos das cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* SP8 e *L. innocua* CLIP 12612 em 5 ml de meio Fraser, TSB-YE, LB e LEB. Os cultivos foram incubados sob agitação por 18 h à 37°C. Para o preparo das amostras, estas foram centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rpm e o *pellet* ressuspenso em 5 mL de PBS 1X e centrifugado por mais 5 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 3 mL

de tampão carbonato-bicarbonato 0,2M (pH 9,7). Após, a Densidade óptica (D.O) foi aferida através de espectrofotômetro e se ajustou a mesma para $DO_{600}=1,0$. As placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 μ L das bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* SP8 e *L. innocua* CLIP 12612 durante 16 h a 4°C. Em seguida, os MAb 3F8 e 2D12, diluídos 1:500 em PBS-T, foram adicionados às placas e incubados 1 h a 37°C. Posteriormente adicionou-se o anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich), o qual foi incubado por 1h a 37°C. A revelação foi realizada com solução contendo H₂O₂ e OPD. Um soro policlonal anti-Listeria (Anti-List.) (MOREIRA, 2013) foi utilizado como controle positivo. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada três vezes com 200 μ L de PBS-T.

4.6 Elisa direto

Os cultivos e preparo das amostras foram realizados conforme descrito anteriormente no item 4.5. As placas de 96 cavidades foram sensibilizadas com 100 μ L das bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* SP8 e *L. innocua* CLIP 12612 cultivadas nos meios Fraser, LEB, TSB-YE e LB durante 16 h a 4°C. Em seguida, os MAb 3F8 e 2D12 marcados com peroxidase, diluídos 1:200 e 1:500, respectivamente, em PBS-T, foram adicionados às placas e incubados por 1 h a 37°C. Para controle negativo, foi adicionado PBS-T. A revelação foi procedida com solução contendo H₂O₂ e OPD. Entre cada etapa de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de PBS-T.

Os testes de ELISA foram realizados em duplicata, porém foram feitos apenas uma única vez.

5 Resultados e Discussão

As cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* ATCC 19117 expressam as proteínas InIA e FBA, já as cepas *L. innocua* SP8 e *L. innocua* CLIP 12612 são capazes de expressar apenas a proteína FBA. A proteína InIA, presente na espécie *L. monocytogenes*, possui aproximadamente 80 kDa, e é reconhecida pelo MAb 2D12. A proteína FBA, enzima que participa da rota metabólica da respiração celular, possui 30 kDa, e é reconhecida pelo MAb 3F8 (MENDONÇA, 2011).

5.1 Avaliação da expressão de InIA e FBA através de SDS-PAGE e *Western blot*.

Para avaliar a expressão dessas proteínas em diferentes meios de cultivo, foi realizado SDS-PAGE 12% e posteriormente, *Western blot* para detectar as proteínas através destes anticorpos específicos. As proteínas recombinantes FBA e InIA foram utilizadas como controles.

Na avaliação da expressão das proteínas InIA e FBA quando *Listeria* spp. foi cultivada nos meios não seletivos BHI, TSB-YE e LB observou-se que a expressão tanto da proteína InIA, quanto da proteína FBA, foi maior quando as cepas de *Listeria* spp. foram cultivadas em meio TSB-YE. A expressão da proteína FBA nos meios BHI e LB também foram significativas, porém em menores quantidades. Além disso, a expressão da proteína InIA foi mais significativa quando em meio BHI, quando comparado ao meio LB (figura 1).

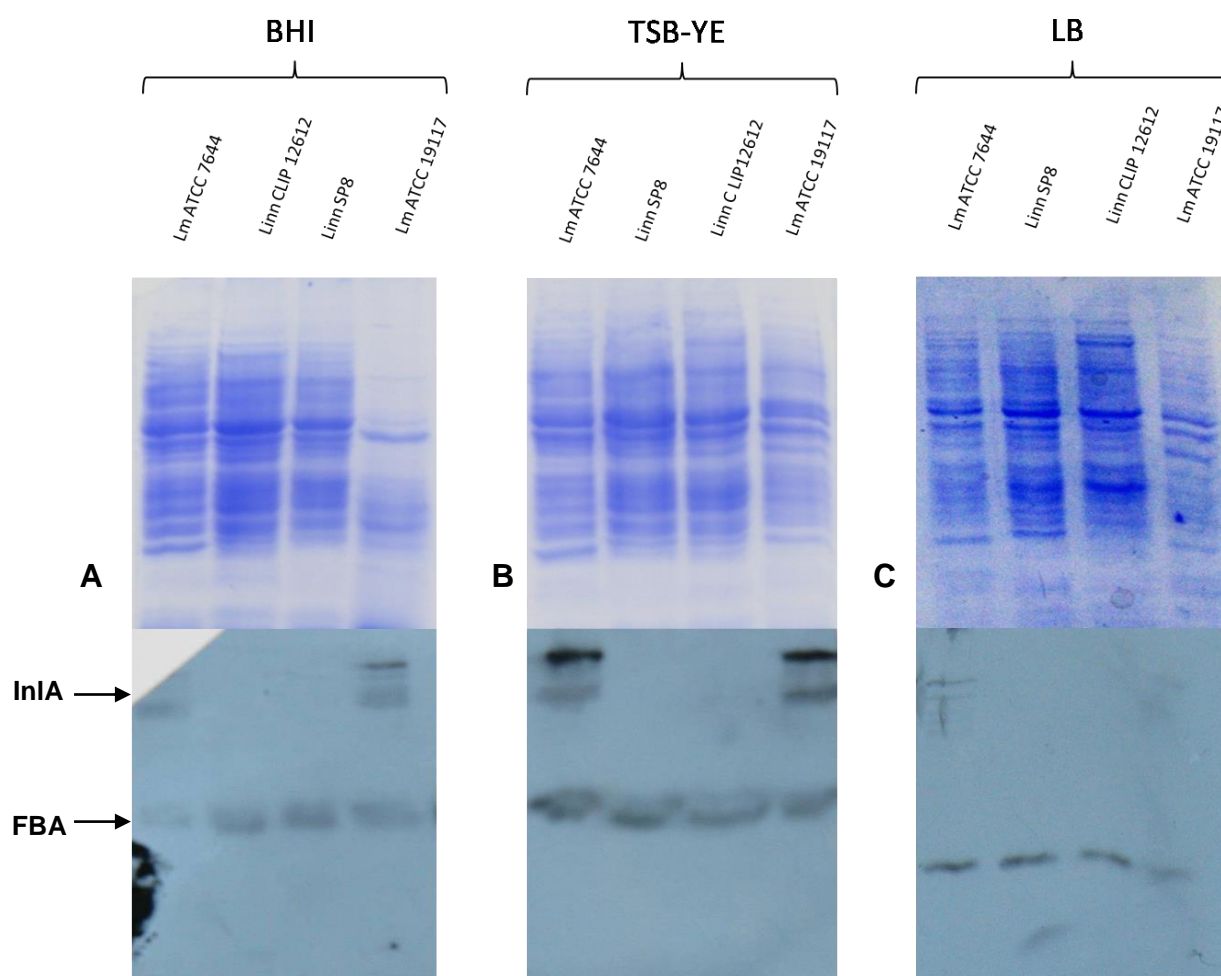


Figura 1. Avaliação da expressão das proteínas InIA e FBA de *Listeria* spp. cultivadas nos meios BHI, TSB-YE e LB através de SDS-PAGE e *Western blot*. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. innocua* (Linn) CLIP 12612, *L. innocua* (Linn) SP8, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117.

Quando a expressão foi avaliada nos caldos seletivos, observou-se que a expressão da proteína FBA foi similar nos meios Fraser e UVM. Já em meio LEB, a expressão desta proteína parece estar diminuída. Quando cultivadas em meio Fraser e LEB, as cepas de *Listeria* spp. apresentaram uma expressão da proteína InIA mais significativa, quando comparada ao meio UVM. Contudo, é possível verificar que a expressão de ambas proteínas foi maior quando em meio Fraser (figura 2).

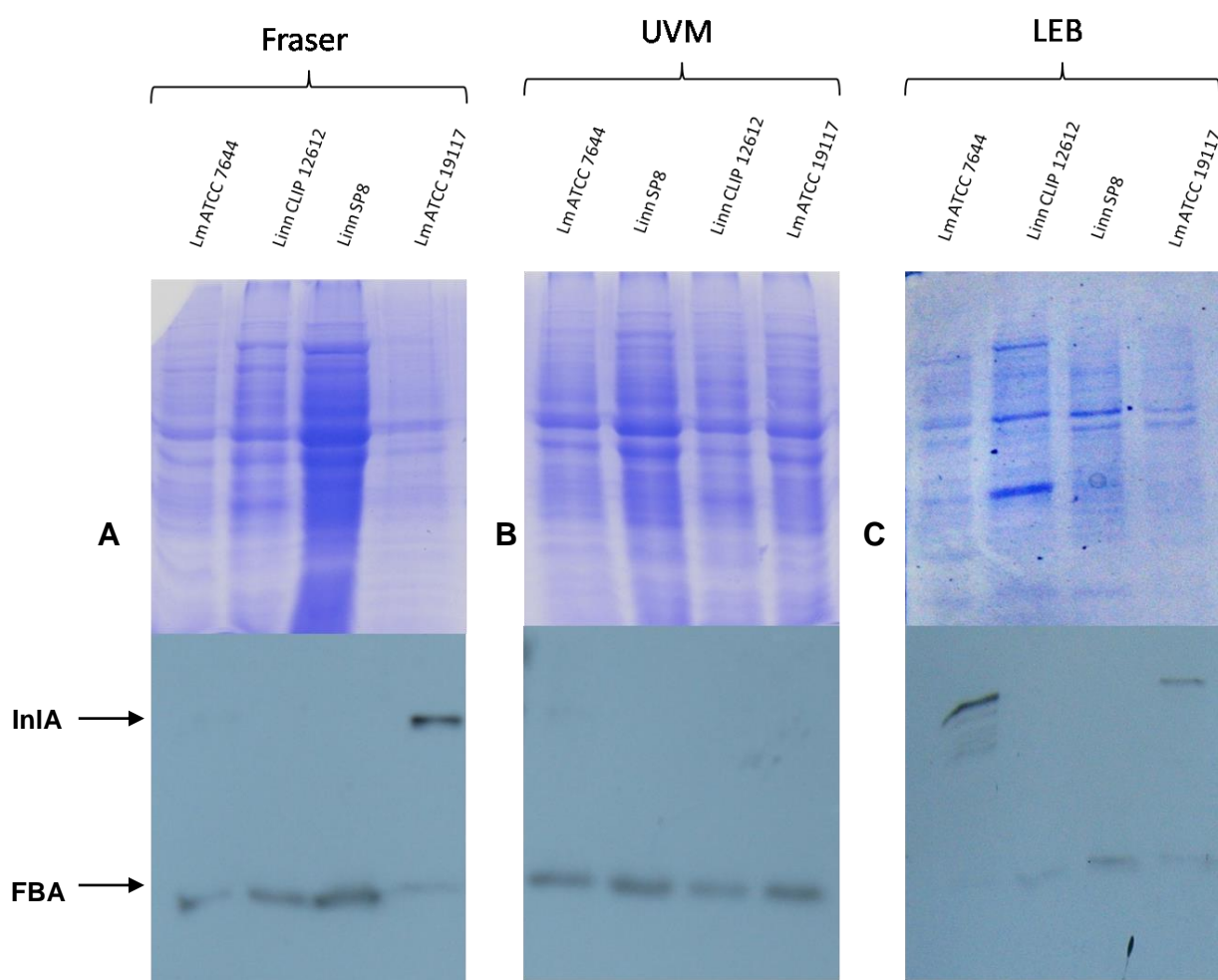


Figura 2. Avaliação da expressão das proteínas InIA e FBA de *Listeria* spp. cultivadas nos meios Fraser, UVM e LEB através de SDS-PAGE e *Western blot*. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. innocua* (Linn) CLIP 12612, *L. innocua* (Linn) SP8, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117.

5.2 Avaliação da expressão de InIA e FBA através de ELISA direto e indireto.

Para avaliar a expressão dessas proteínas em diferentes meios de cultivo, foi realizado ELISA direto através dos MAb's 2D12 e 3F8 marcados com peroxidase e indireto através dos MAb's 2D12 e 3F8, para detectar as proteínas através destes anticorpos específicos.

Quando a cepa *L. innocua* SP8 foi cultivada em meio TSB-YE, esta apresentou maiores valores de absorvância (DO_{450}) para os MAb's 3F8 e 3F8 marcado com peroxidase, apresentando valores que variaram entre 0,219 – 0,374 e

e 0,262 – 0,274, respectivamente. A cepa *L. innocua* CLIP 12612 também apresentou maiores valores de absorvância (DO_{450}) para os MAb 3F8 e 3F8 marcado com peroxidase, com valores que variaram entre 0,176 – 0,388 e 0,179 – 0,286 respectivamente (figura 3). Este é um resultado positivo, já que estas cepas expressam apenas a proteína FBA, e assim, podem ser reconhecidas apenas pelo MAb 3F8. Já a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644, quando cultivada neste mesmo meio de cultivo, apresentou valores mais expressivos tanto para o MAb 3F8 quanto para o MAb 2D12, apresentando valores que variaram entre 0,294 – 0,324 e 0,252 – 0,269, respectivamente. A cepa *L. monocytogenes* ATCC 19117 também apresentou maiores valores para os MAb 3F8 e 2D12, os quais variaram entre 0,191 – 0,227 e 0,167 – 0,169, respectivamente (figura 3). Estas expressam tanto a proteína FBA quanto a InIA e são, portanto, capazes de serem reconhecidas por ambos os MAb.

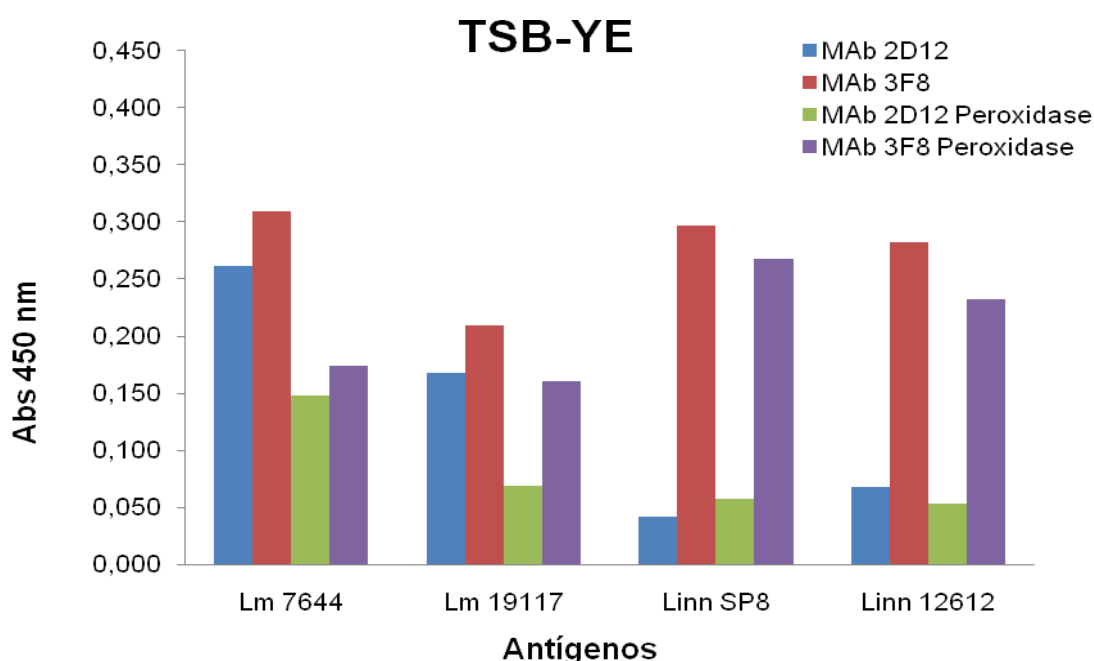


Figura 3 - ELISA direto e indireto de *Listeria* spp. em meio de cultivo TSB-YE. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117, *L. innocua* (Linn) SP8 e *L. innocua* (Linn) CLIP 12612. Resultados expressos com médias das duplicatas.

Quando a cepa *L. innocua* SP8 foi cultivada em meio LB, esta apresentou maiores valores de absorvância (DO450_{nm}) para os MAb 3F8 e 3F8 marcado com peroxidase, os quais variaram, entre 0,273 - 0,284 e 0,140 – 0,145, respectivamente, enquanto que a cepa *L. innocua* CLIP 12612 apresentou maiores valores de absorvância para os MAb 3F8 e 3F8 marcado com peroxidase, os quais variaram entre 0,261 – 0,266 e 0,194 – 0,196 (figura 4). Estes dados demonstram um resultado positivo, já que esta espécie expressa apenas a proteína FBA. Quando a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi cultivada no mesmo meio, esta apresentou valores mais significativos para os MAb 2D12, 2D12 marcado com peroxidase e 3F8, com valores de absorvância que variaram entre 0,425 – 0,431, 0,377 – 0,440, e 0,180 – 0,263, respectivamente. A cepa *L. monocytogenes* ATCC 19117 também apresentou maiores valores para os MAb 2D12, 2D12 marcado com peroxidase e 3F8, os quais variaram entre 0,310 – 0,333, 0,114 – 0,118 e 0,148 – 0,220, respectivamente (figura 4). Um resultado esperado, já que estas cepas expressam ambas proteínas (InIA e FBA), e, portanto, são capazes de serem reconhecidas por ambos os MAb (3F8 e 2D12).

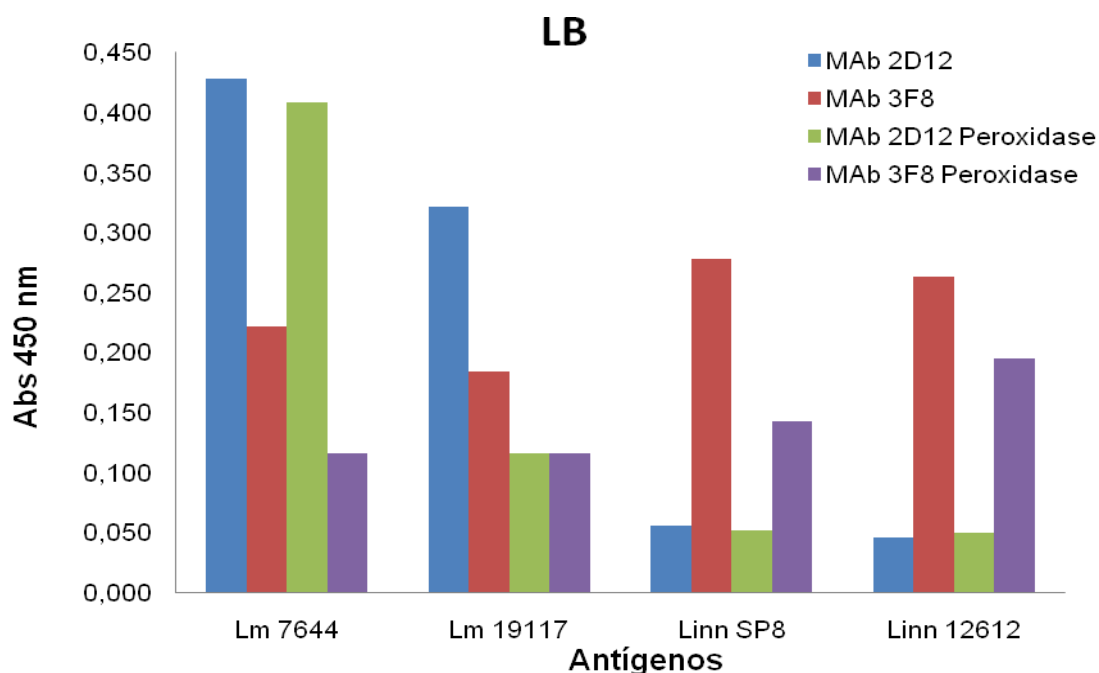


Figura 4 - ELISA direto e indireto de *Listeria* spp. em meio de cultivo LB. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117, *L. innocua* (Linn) SP8 e *L. innocua* (Linn) CLIP 12612. Resultados expressos com médias das duplicatas.

Quando cultivada em meio Fraser, a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentou um valor mais expressivo de absorvância (DO_{450}) para os MAb 2D12 e 2D12 marcado com peroxidase, os quais variaram entre 0,326 – 0,329 e 0,170 – 0,208 respectivamente, enquanto que a cepa *L. monocytogenes* ATCC 19117 apresentou maiores valores de absorvância para o MAb 2D12 (0,151 – 0,168) (figura 5). Resultados estes esperados e satisfatórios, já que estas são capazes de serem reconhecidas pelos dois MAb. Já a cepa *L. innocua* SP8 quando cultivada no mesmo meio de cultivo, apresentou valores de absorvância mais expressivos para os MAb 2D12 e 3F8, apresentando valores que variaram entre 0,115 – 0,129 e 0,118 – 0,123, respectivamente. A cepa *L. innocua* CLIP 12612 também apresentou maiores valores para os MAb 2D12 e 3F8, os quais variaram entre 0,083 – 0,088 e 0,091 – 0,114, respectivamente (figura 5), o que demonstra algum erro de procedimento, já que estas cepas são capazes de serem reconhecidas apenas pelo MAb 3F8, pois expressam apenas a proteína FBA.

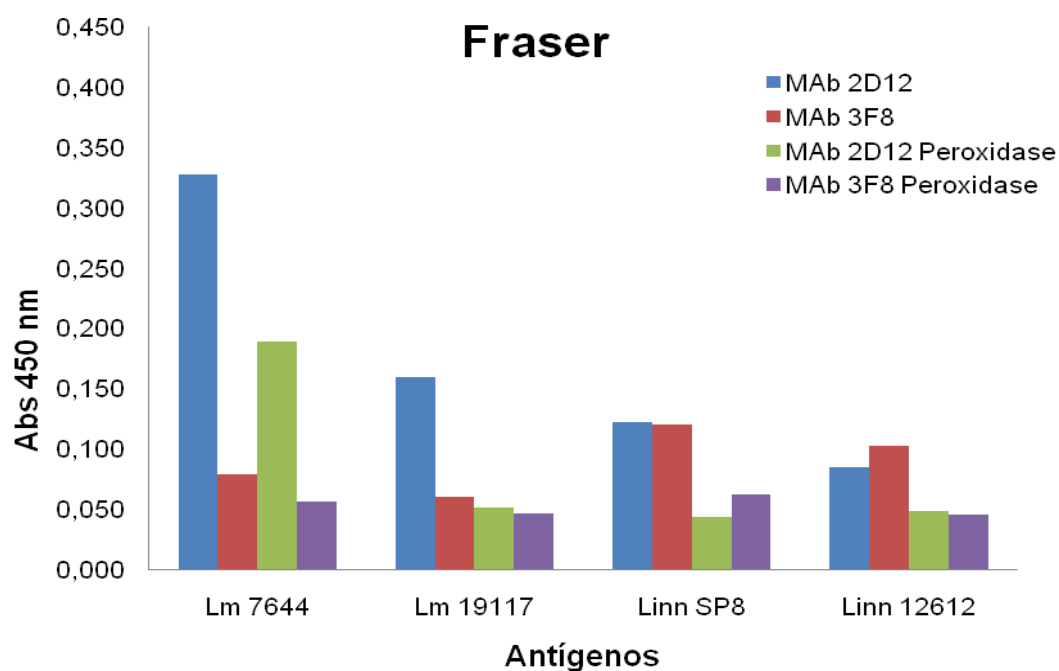


Figura 5 - ELISA direto e indireto de *Listeria* spp. em meio de cultivo Fraser. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117, *L. innocua* (Linn) SP8 e *L. innocua* (Linn) CLIP 12612. Resultados expressos com médias das duplicatas.

Quando a cepa *L. innocua* SP8 foi cultivada em meio LEB, esta demonstrou valores de absorvância (DO_{450}) mais significativos para os MAb 2D12 e 3F8, os quais variaram entre 0,184 – 0,190 e 0,128 – 0,132, respectivamente. A cepa *L. innocua* CLIP 12612 também apresentou maiores valores para os MAb 2D12 e 3F8, os quais variaram entre 0,055 – 0,120 e 0,064 – 0,066, respectivamente, (figura 6), mostrando que algum erro pode ter ocorrido durante o procedimento, já que estas cepas são capazes de expressar apenas a proteína FBA, que é reconhecida pelo MAb 3F8. Já a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644, demonstrou maiores valores de absorvância para os MAb 2D12 e 2D12 marcado com peroxidase com valores que variam entre 0,140 – 0,160 e 0,103 – 0,140, respectivamente. Enquanto que a cepa *L. monocytogenes* ATCC 19117, apresentou valor de absorvância mais expressivo para o MAb 2D12 (0,066 – 0,137) (figura 6). Resultados estes positivos e esperados.

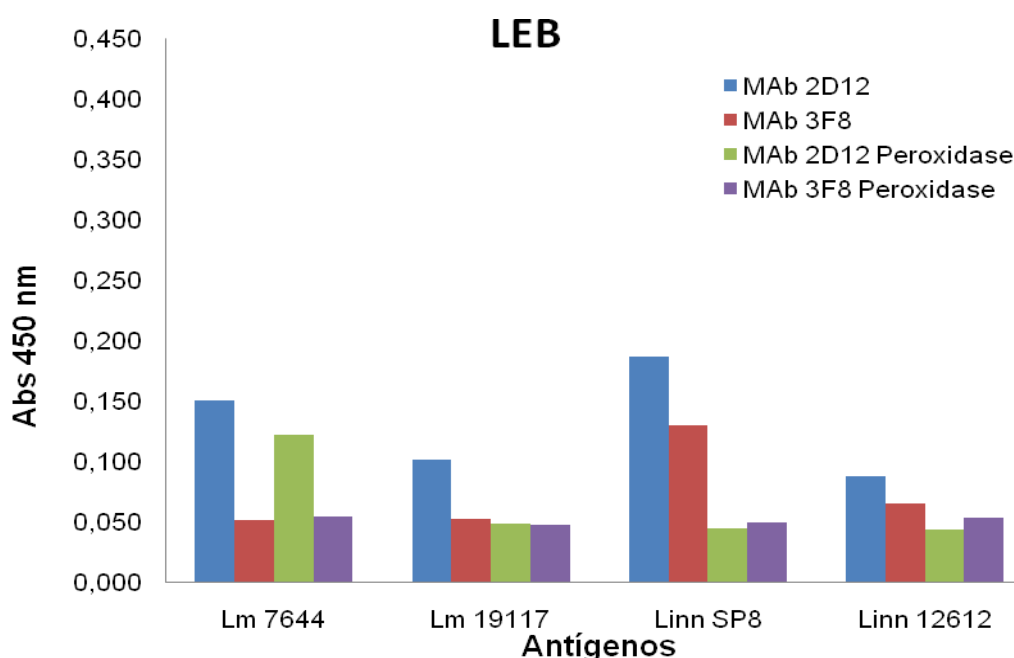


Figura 6 - ELISA direto e indireto de *Listeria* spp. em meio de cultivo LEB. *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 7644, *L. monocytogenes* (Lm) ATCC 19117, *L. innocua* (Linn) SP8 e *L. innocua* (Linn) CLIP 12612. Resultados expressos com médias das duplicatas.

Este estudo sugere que a expressão das proteínas InIA e FBA é superior nos meios não seletivos TSB-YE e LB. Entretanto, devido às limitações deste trabalho, os testes deverão ser repetidos a fim de ratificar os resultados obtidos.

6 Conclusões

- ✓ Através do *Western blot*, foi possível observar que a expressão da proteína InIA foi mais significativa em meio TSB-YE e menos expressiva em meio UVM. Já a expressão da proteína FBA se mostrou similar entre os meios, apresentando uma menor expressão apenas em meio LEB;
- ✓ Através do ELISA, foi possível constatar que as cepas apresentaram valores de absorvância semelhantes quando cultivadas nos meios não seletivos TSB-YE e LB. Quando cultivadas nos meios seletivos, as cepas de *L. monocytogenes* apresentaram maiores valores de absorvância no meio Fraser, enquanto que as cepas de *L. innocua* demonstraram valores mais significativos no meio LEB;
- ✓ Foi possível verificar que tanto a proteína InIA, quanto a proteína FBA, apresentaram maiores expressões, quando as cepas *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* ATCC 19117, *L. innocua* CLIP 12612 e *L. innocua* SP8 foram cultivadas em meio TSB-YE e LB, ambos caldos de enriquecimento não seletivos para *Listeria* spp..

7 Perspectivas

- ✓ Estudos futuros são necessários visando a repetição desses experimentos, a fim de confirmar ou não esses dados;
- ✓ Será realizada a suplementação dos meios de cultivo, uma vez que já foi observado em outros estudos, que o fenômeno de crescimento na maioria dos casos tem uma base nutricional.

8 Referências

AGOSTINI, C.; KRELING, C.S.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; SOUZA, C.F.V.; BIOLCHI, V.; POZZOBON, A. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de leite bovino *in natura*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p.15-20, 2012.

ALLERBERGER, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 183-189, 2003.

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 16–23, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 abril 2009.

BERTSCH, D., RAU, J., EUGSTER, M.R., HAUG, M.C., LAWSON, P.A., LACROIX, C., MEILE L., *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 526–532, 2013.

CDC, 2011. Multistate Outbreak of *Listeriosis* Associated with Jensen Farms Cantaloupe - United States, August - September 2011. **MMWR**, v.60, n.39, p.1357-1358, 2011.

CORRÊA, W.M. & CORRÊA, C.N.M. **Listeriose. In: Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.** 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, cap. 24, p. 367- 373, 1992.

COSSART, P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, p.1143-1146, 2007.

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

DALTON, C.B., AUSTIN, C.C., SOBEL, J., HAYES, P.S., BIBB, W.F., GRAVES, L.M., ET AL. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, v. 336, p. 100-105, 1997.

DEN BAKKER, H. C., WARCHOCKI, S., WRIGHT, E. M., ALLRED, A. F., AHLSTROM, C., MANUEL, C. S., STASIEWICZ, M. J., BURRELL, A., ROOF, S., STRAWN, L. K., FORTES, E., NIGHTINGALE, K. K., KEPHART, D. and WIEDMANN, M. 2014. *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64, 1882-1889, 2014.

GASANOV, U., HUGHES, D., HANSBRO, P.M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 5, p. 851–875, 2005.

GENG, T., HAHM, B.K. AND BHUNIA, A.K. Selective enrichment media affect the antibody-based detection of stress-exposed *Listeria monocytogenes* due to differential expression of antibody-reactive antigens identified by protein sequencing. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 8 p. 1879–1886, 2006.

GRAVES L.M., HELSEL L.O., STEIGERWALT A.G., MOREY R.E., DANESHVAR M.I., ROOF S.E., ORSI R.H., FORTES E.D., MILILLO S.R., DEN BAKKER H.C., WIEDMANN M., SWAMINATHAN B., SAUDERS B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, p. 1280 - 1288, 2010.

HALTER, L.A., NEUHAUS, K., SCHERER, S., *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63. p. 641-647, 2013.

HOFER, E.; FALAVINA DOS REIS, C.M. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.

HOFER, E.; FALAVINA DOS REIS, C.M.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 32-37, 2006.

IVANEK, R. GROHN, Y. T. WIEDMANN. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 3, p. 319-336, 2006.

JANZTEN, M.M.; NAVAS, J.; CORUJO, A.; MORENO, R.; LÓPEZ, V.; MARTÍNEZSUAREZ, V.J. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 235–247, 2006.

KASNOWSKI, M.C. ***Listeria* spp., *Escherichia coli*: isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída**. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2004.

MENDONÇA, M. **Anticorpos monoclonais contra *Listeria* spp.: Produção, Caracterização e Aplicação em Métodos Diagnósticos**. 2011. 109 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2011.

MENDONÇA, M., CONRAD, N.L., CONCEIÇÃO, F.R., MOREIRA, A.N., SILVA, W.P., ALEIXO, J.A.G., BHUNIA, A.K. Highly specific fiber optic immunosensor coupled with immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. **BMC Microbiology**, 12, 275-290, 2012.

MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia. **Caracterização de proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais para o desenvolvimento de vacinas e**

testes diagnósticos. 2013. 88 f. Monografia (Conclusão de curso). Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MEGE R-M; COSSART, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 923–932, 1996.

NANNAPANENI, R.; STORY, R.; BHUNIA, A. K.; JOHNSON, M.G. Reactivities of Genus-Specific Monoclonal Antibody EM-6E11 against *Listeria* Species and Serotypes of *Listeria monocytogenes* Grown in Nonselective and Selective Enrichment Broth Media. **Journal of Food Protection**, v.61, n.9, p. 1195-1198(4) 1998.

ORAVCOVÁ, K.; TRNCÍKOVÁ, T.; KUČHTA, T.; KACLÍKOVÁ, E. Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 2, p. 429–437, 2008.

PENTECOST, M.; KUMARAN, J.; GHOSH, P.; AMIEVA, M.R. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 5, p. e1000900, 2010.

PIZARRO-CERDÁ, J.; PAYRASTRE, B.; WANG, Y.-J.; VEIGA, E.; YIN, H.L.; COSSART, P. Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 2381–2390, 2007.

POYART, C.; TRIEU-CUOT, P.; BERCHE, P. The *inlA* gene required for cell invasion is conserved and specific to *Listeria monocytogenes*. **Microbiology** (Reading, England), v. 142, n. 1, p. 173–180, 1996.

PRON, B.; BOUMAILA, C.; JAUBERT, F.; BERCHE, P.; MILON, G.; GEISSMANN, F.; GAILLARD, J.L. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 331–340, 2001.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K.J. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 158–171, 2008.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: Ryser, E.T, Marth E.H. **Listeria, Listeriose, and Food Safety**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, v.1, p.1-20, 2007.

SHEEHAN, B., KOCKS, C., DRAMSI, S., GOUIN, E., KLARSFELD, A.D., MENGAUD, J., AND COSSART, P. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. **Current Topics Microbiology Immunology**, v. 192, p.187-216, 1994.

SCHLECH, W., LAVIGNE, P., BORTOLUSSI, R., ALLEN, A., HALDANE, V., WORT, J., ET AL. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**, v. 308, p. 203-206, 1983.

SCHWAB, J.P.; EDELWEISS, M.I.A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro Apr./June v. 39, n.2, 2003.

SILVA, Fernando Merlin. ***Listeria monocytogenes*: um perigo invisível nos alimentos**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). 2009. Faculdade de Medicina Veterinária - Faculdades metropolitanas unidas. São Paulo, 2009.

SILVA, Vanessa Silva da. **Expressão diferencial da proteína internalina A em *Listeria monocytogenes* do sorotipo 4b de diferentes origens em caldos de enriquecimento seletivos e não-seletivos**. 2011. 69p. Dissertação (Mestrado). 2011. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

SOFOS, J.N, YOON, Y. Safer food using predictive modeling. **Fleischwirtschaft International**, n. 3, p. 16-21. 2006.

STOLL, S.N., MOREIRA, G.M.S.G., MENDONÇA, M., CONRAD, N.L., MOREIRA, A.N., CONCEIÇÃO, F.R., ALEIXO, J.A.G., Avaliação de Anticorpos Monoclonais Marcados com Peroxidase para Desenvolvimento de Teste de Detecção de *Listeria*

monocytogenes e *Listeria* spp. em Alimentos. **VI Simpósio de Micro Aplicada e II Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada**. Porto Alegre- RS, 2012.

STOLL, S.N., MENDONÇA, M, ROSA, R.L., MOREIRA, G.S.G.M., MOREIRA, A.N., CONCEIÇÃO, F.R. Detecção Rápida de *Listeria monocytogenes* em Amostra de Queijo Minas Frescal por *Western Blot*. **XXIII Congresso de Iniciação Científica**. Pelotas – RS, 2014.

TROST, M.; WEHMHÖNER, D.; KÄRST, U.; DIETERICH, G.; WEHLAND, J.; JÄNSCH, L. Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Proteomics**, v. 5, n. 6, p. 1544–1557, 2005.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.

VIDAL, A.M.B.; CATAPANI, W.R. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) immunoassaying versus microscopy: advantages and drawbacks for diagnosing giardiasis. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 6, 2005.

VON LAER, A.; LIMA, A. DE; TRINDADE, P.; ANDRIGUETTO, C.; DESTRO, M.; SILVA, W. DA. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 574–582, 2009.

WERBROUCK, H.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN PAMEL, E.; RIJPENS, N.; VAN DAMME, J.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E. Differential inIA and inIB expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3862–3871, 2006.

ZITZ, U.; ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K.J.; WILRICH, P.-T.; KNEIFEL, W. Reduced detectability of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Listeria innocua*. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 8, p. 1282–1287, 2011.

WELLER, D.; ANDRUS, A.; WIEDMANN M.; DEN BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 286 – 292, 2015.