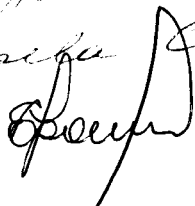


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PATOGENICIDADE DE CEPAS DE *Listeria monocytogenes*
ISOLADAS DE ALIMENTOS E MATERIAL CLÍNICO CULTIVADAS
EM DIFERENTES TEMPERATURAS

Resumo

Este exemplar corresponde ao resumo final da tese defendida por Vera Lúcia Nobrega da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora em 24/04/95



VERA LUCIA NOBREGA DA SILVA

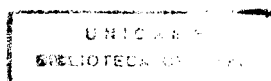
ORIENTADOR:

PROF. DR. EDIR NEPOMUCENO DA SILVA

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE
ALIMENTOS DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA
A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CAMPINAS, SP.

1995



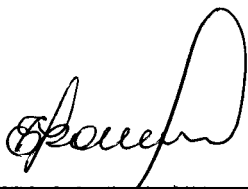
FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

Si38p Silva, Vera Lucia Nobrega da
Patogenicidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de alimentos e material clínico cultivadas em diferentes temperaturas / Vera Lucia Nobrega da Silva. -- Campinas, SP : [s.n.] , 1995.

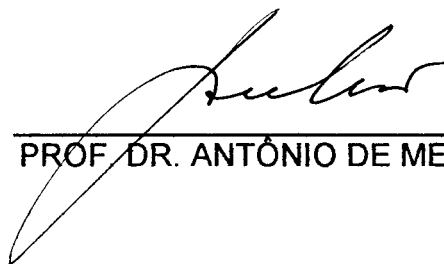
Orientador: Edir Nepomuceno da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Patogenicidade. 2. Embrião de Ave. 3. Macrófagos. 4. *Células - Invasão. 5. *Células vero. I. Silva, Edir Nepomuceno da. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



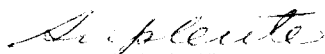
PROF. DR. EDIR NEPUMUCENO DA SILVA



PROF. DR. ANTÔNIO DE MELO SERRANO



PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA



PROF. DR. PEDRO EDUARDO DE FELÍCIO

*A meus pais,
que com muito sacrifício e privações
propiciaram a minha formação.*

A minha filha Mariana, pela compreensão.

AGRADECIMENTOS :

- Ao Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva, pelo apoio, amizade e orientação deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Antonio de Melo Serrano, pelas correções e sugestões apresentadas, meu muito obrigada.
- Ao Prof. Dr. José Luiz Pereira, também pelas correções sugeridas.
- Ao Dr. José Guedes Deak, por ter proporcionado a realização deste trabalho no Laboratório de Referência Animal, Lara-Campinas.
- A Prof. Dra. Dagmar Stock Machado, pela contribuição técnica no início da pesquisa.
- A Prof. Maria Tereza Destro, pelo fornecimento das cepas de bactéria de origem alimentar utilizadas neste estudo.
- Ao Prof. Dr Ernesto Hofer, pelo fornecimento das cepas de bactéria de origem clínica utilizadas neste estudo.
- A Prof. Dra. Isabel C. A. Scaletsky, pelo estágio concedido na Escola Paulista de Medicina.
- A Granja Ito, pelo fornecimento de ovos.
- Aos colegas e amigos do Lara-Campinas, tanto pelo apoio técnico como pela amizade e carinho.

- As funcionárias do Laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos (UNICAMP).
- Ao Paulo Machado Martincowski, pela amizade, companheirismo e pela ajuda nos meandros do raciocínio, meu eterno carinho.
- A Prof. e amiga Silvana Venâncio, pelo apoio e estímulo.
- Ao José Roberto A. Aranha, pela dedicação na digitação e editoração deste trabalho.
- A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram durante esses anos para a realização desta tese.

Muito obrigada.

ÍNDICE GERAL

PÁGINA

RESUMO	I
SUMMARY	II
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	III
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. Características da espécie <i>L. monocytogenes</i>	4
3.1.1. Taxonomia	4
3.1.2. Morfologia e características culturais	5
3.1.3. Características bioquímicas.....	6
3.1.4. Sorotipos e fagotipos de <i>L. monocytogenes</i>	8
3.2. Habitat.....	9
3.2.1. Modos de transmissão.....	10
3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....	12
3.3.1. Ocorrência	12

3.3.2. Resistência térmica em alimentos	13
3.3.3. Sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> durante o processamento e estocagem de alimentos	15
3.3.4. Surtos de Listeriose de origem alimentar	17
3.3.5. Métodos de detecção e identificação	18
3.4. Listeriose em mamíferos, aves, crustáceos e peixes	20
3.5. Listeriose humana.....	21
3.5.1. Mecanismo da patogenicidade	22
3.5.2. Fatores de virulência.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1. Material	28
4.1.1. Cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	28
4.1.2. Células Vero	29
4.1.3. Macrófagos peritoneais.....	29
4.1.4. Ovos embrionados.....	29
4.1.5. Meios de cultura.....	30
4.1.6. Reagentes e soluções	30
4.1.7. Equipamentos	31
4.2. Métodos	32
4.2.1. Caracterização das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i>	32
4.2.2. Invasão e multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em células Vero	34
4.2.2.1. Preparo das suspensões bacterianas.....	34
4.2.2.2. Cultivo de células Vero em lamínulas e em tubos de ensaio	35
4.2.2.3. Infecção dos cultivos celulares	36
4.2.2.4. Leitura microscópica dos cultivos celulares.....	37
4.2.2.5. Enumeração bacteriana dos cultivos celulares.....	37
4.2.3. Invasão e multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em macrófagos	38

4.2.3.1. Preparo das suspensões bacterianas.....	38
4.2.3.2. Cultivo de macrófagos em lamínulas e em tubos de ensaio	39
4.2.3.3. Infecção dos cultivos celulares	41
4.2.3.4. Leitura microscópica dos cultivos celulares.....	41
4.2.3.5. Enumeração bacteriana dos cultivos celulares.....	42
4.2.4. Dose letal 50% (DL ₅₀) para embriões de galinha de cepas de <i>L. monocytogenes</i> cultivadas em diferentes temperaturas.....	42
4.2.4.1. Preparo das suspensões bacterianas.....	42
4.2.4.2. Infecção dos ovos embrionados	43
4.2.4.3. Leitura dos resultados.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Invasão de <i>L. monocytogenes</i> em células Vero	44
5.2. Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em células Vero.....	46
5.3. Invasão de <i>L. monocytogenes</i> em macrófagos	49
5.4. Multiplicação de <i>L. monocytogenes</i> em macrófagos.....	53
5.5. Dose letal 50% para embriões de galinha.....	62
6. CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE.....	93

RESUMO

Esta pesquisa teve por objetivo estudar a patogenicidade de cepas de *L. monocytogenes* cultivadas a 4, 22 e 37°C em células Vero, macrófagos e embriões de galinha.

Foram utilizados dois grupos de cepas: um isolado de listeriose humana e outro isolado de alimentos, tendo sido incluído uma cepa padrão patogênica "Scott A" e uma cepa de *L. innocua*, avirulenta.

Primeiramente, determinamos algumas características morfológicas, bioquímicas e sorológicas das cepas. Todas apresentaram as características próprias da espécie, sendo que as amostras isoladas de casos clínicos humanos eram pertencentes ao sorotipo 4b. As que foram isoladas de alimentos eram pertencentes ao sorotipo 1/2a e 1/2b.

Em outra fase estudamos a cinética de invasão e multiplicação de *L. monocytogenes* em cultivo de células Vero e macrófagos e o efeito da temperatura de cultivo da bactéria neste processo.

Em macrófagos, a invasão e multiplicação foi mais efetiva do que em células Vero, e dependente do tempo após a inoculação e temperatura de cultivo das cepas. As cepas clínicas apresentaram maior capacidade de multiplicação a 4 e 37°C do que as isoladas de alimentos.

A cepa 132 procedente de alimento foi mais invasiva em macrófagos do que as outras duas da mesma origem.

A inoculação de *L. monocytogenes* em células Vero não serviu para diferenciar as cepas clínicas das alimentares, nem mostrou diferença entre cepas cultivadas em diferentes temperaturas.

Na última etapa da pesquisa, determinamos a dose letal 50% (DL₅₀) para embriões de galinha.

Embriões de galinha serviram como bom modelo para o estudo da patogenicidade de cepas cultivadas e mantidas em diferentes temperaturas. Cepas cultivadas e mantidas a 4°C se mostraram mais patogênicas do que cepas cultivadas e mantidas em temperaturas mais elevadas.

SUMMARY

We studied pathogenicity of *L. monocytogenes* strains grown at 4, 22 and 37°C on Vero cells, macrophages and chicken embryos.

Two groups of strains were used: one isolated from human listeriosis and another isolated from food, including one standard pathogenic "Scott A" strain and one avirulent *L. innocua*

For all strains, it was established morphologically, some biochemical characteristics and serogrouping. All have shown its own species characteristics. Samples isolated from human listeriosis belonged to serovar 4b and the ones isolated from food belonged to serovar 1/2a and 1/2b.

The kinetics of invasion and multiplication of *L. monocytogenes* on Vero and macrophage cell cultures and the effect of the growth temperature on the bacteria in this process was studied.

With macrophages, the invasion and multiplication were more effective than with Vero cells, and was dependant on inoculation time and cultivation temperature of the strains. The clinical strains showed a better ability for multiplication at 4 and 37°C than the ones isolated from food.

One strain from food was more invasive for macrophages than the other two ones from the same origin.

The inoculation of *L. monocytogenes* on Vero cells was not useful to differentiate the clinical from the food strains. One did not even show any difference between strains growth at different temperatures.

The lethal dose 50% (LD₅₀) for chicken embryos was established for all strains and its appear a good model to the study pathogenicity of cultured strains kept at different temperatures. Strains cultured and kept at 4°C showed more pathogenicity than the ones cultured and kept at higher temperatures.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

PÁGINA

TABELA 1 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após oito horas de inoculação com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas	45
TABELA 2 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após doze horas de inoculação com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas	47
TABELA 3 - Índice de multiplicação em células Vero para as diferentes cepas de <i>Listeria</i> cultivadas a 4, 22 e 37°C	48
TABELA 4 - Número de células bacterianas no interior de macrófagos após uma hora de inoculação com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas	50
TABELA 5 - Número de células bacterianas no interior de macrófagos após treze horas de inoculação com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas	53
TABELA 6 - Índice de multiplicação em macrófagos para as diferentes cepas de <i>Listeria</i> cultivadas a 4, 22 e 37°C	54
TABELA 7 - Doses letais 50% (DL ₅₀) de cepas de <i>Listeria</i> cultivadas a 4, 22 e 37°C para ovos embrionados de galinha. Valores obtidos pela média de seis repetições do teste.	63

QUADRO 1 - Características bioquímicas das espécies de <i>Listeria</i>	7
QUADRO 2 - Cepas de <i>Listeria</i> utilizadas no estudo	28
QUADRO 3 - Número de células bacterianas, cultivadas a 4°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.....	58
QUADRO 4 - Número de células bacterianas, cultivadas a 22°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.....	59
QUADRO 5 - Número de células bacterianas, cultivadas a 37°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.....	60
GRÁFICO 1 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após oito horas de contato com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas.	45
GRÁFICO 2 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após uma hora de contato com cepas de <i>Listeria</i> cultivadas em diferentes temperaturas.	50
FIGURA 1 - Rotas de transmissão de <i>L. monocytogenes</i> segundo RYSER & MARTH (1991).....	11

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes foi descrita, pela primeira vez, em 1926, durante uma epizootia em animais de laboratório. Contudo, um microrganismo que correspondia exatamente à descrição dessa bactéria já tinha sido isolado de foco necrótico de coelho em 1911.

Desde então, a *L. monocytogenes* tem sido reconhecida como um patógeno oportunista causando infecções isoladas e epidemias esporádicas no homem e em várias espécies animais.

Nos últimos anos, a *L. monocytogenes* tem emergido como um perigoso patógeno para humanos, sendo causador de severas infecções incluindo septicemia, abortos, meningite e meningoencefalite.

A listeriose é mais freqüente em neonatos, mulheres grávidas e indivíduos imunodeficientes, sugerindo a necessidade de fatores predisponentes do hospedeiro. Por outro lado, tem-se diagnosticado, também, listeriose em indivíduos aparentemente imunocompetentes.

A *L. monocytogenes* é um microorganismo psicrotrófico que se multiplica em ampla faixa de temperatura (-0,4°C a 50°C). Está amplamente disseminada no meio ambiente, vivendo nas mais diversas condições, podendo ser encontrada na água, solo, vegetação, silagem e material fecal.

Apenas recentemente é que se correlacionaram alimentos como fonte de *L. monocytogenes* para o homem. Isto se deu num surto de listeriose ocorrido em hospitais de Boston, (EUA) em 1979, onde 20 pessoas desenvolveram a doença, presumivelmente, devido a ingestão de alface, tomate e salsão crus, contaminados.

Posteriormente, outros surtos de listeriose foram diagnosticados e confirmados em várias partes do mundo relacionando alimentos como fonte de infecção.

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas na determinação da ocorrência e incidência de *L. monocytogenes* em diferentes tipos de

alimentos e no desenvolvimento de técnicas mais rápidas e precisas para o isolamento deste agente. Ele tem sido isolado de uma grande variedade de alimentos incluindo carne bovina, carne de frango, produtos lácteos, marinhos e produtos vegetais.

A taxa de isolamento de *L. monocytogenes* de alimentos é muito elevada, mas os casos e surtos de listeriose humana são muito raros.

Podemos especular que, para a ocorrência de listeriose, é necessário combinar fatores predisponentes do hospedeiro e a ingestão de alimentos com alta dose infectante do agente.

Ou pode ser que apenas algumas poucas cepas de *L. monocytogenes* possuem os fatores de virulência capazes de provocar a doença ou que estes fatores possam ser modulados pela composição do alimento, tempo e temperatura de armazenagem. Neste caso, seria verdadeiro supor que toda amostra isolada de listeriose possui os fatores acima e que nem todas as amostras isoladas de alimentos trazem os fatores de virulência necessários para causar a listeriose.

Neste trabalho exploramos a segunda hipótese que enfatiza a virulência da bactéria na ocorrência de listeriose.

Para determinação da virulência de *L. monocytogenes* têm sido recomendados, entre outros testes, o uso de linhagens de células para a verificação de aderência, penetração e multiplicação intracelular, enumeração de células viáveis em baço e fígado e dose letal 50% para camundongos e embriões de galinha.

Selecionamos para estudo, o teste "in vitro" com célula macrófago por ser esta considerada uma das mais importantes na multiplicação "in vivo" de *L. monocytogenes*; analogamente, efetuamos o teste com célula Vero por não se conhecer efetivamente o comportamento dessa bactéria em contato com a mesma.

Finalmente, realizamos o teste "in vivo" utilizando ovos embrionados com a finalidade de determinarmos a dose letal 50%.

2. OBJETIVOS

Desta maneira, planejamos trabalhar com dois grupos de *L. monocytogenes*: um de cepas isoladas a partir de listeriose humana e, outro, isoladas a partir de alimentos. Incluímos, no estudo, uma cepa padrão patogênica e uma cepa de *L. innocua* avirulenta, como padrão negativo.

Nossos objetivos foram, portanto, com relação a estes dois grupos de *L. monocytogenes*:

- Estudar a cinética de invasibilidade e multiplicação em células Vero e macrófagos, e o efeito de diferentes temperaturas de cultivo da bactéria neste processo.
- Determinar a dose letal 50% para embriões de galinha.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE *L. monocytogenes*

3.1.1. TAXONOMIA

Listeria monocytogenes foi a única espécie reconhecida do gênero *Listeria* até 1961; *L. denitrificans*, *L. grayi* e *L. murrayi* foram incluídas no gênero em 1961, 1966 e 1971, respectivamente (ROCOURT et alii, 1982). Posteriormente, cepas não patogênicas de *L. monocytogenes* foram reconhecidas como uma nova espécie, *L. innocua* (SEELIGER, 1984; SEELIGER & JONES, 1986) e, em 1983, outras duas espécies passaram a pertencer ao gênero, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*. (SEELIGER & JONES, 1986).

Segundo SEELIGER & JONES (1986), o gênero *Listeria* contém as espécies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, e as espécies *L. grayi*, *L. murrayi* e *L. denitrificans* categorizadas como espécies "incertae sedis".

Recentemente, a atual posição taxonômica do gênero *Listeria* inclui as espécies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi*. *L. denitrificans* é excluída do gênero e transferida para um novo gênero, *Jonésia*, como *J. denitrificans*. O gênero está estritamente relacionado com o gênero *Brochothrix* e ambos os gêneros ocupam uma posição entre *Lactobacillus* e *Bacillus* e estão mais distantemente relacionados com *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphilococcus*, *Kurthia*, *Gemella* e *Erysipelothrix*. (SEELIGER, 1984; JONES & SEELIGER, 1987; ROCOURT, 1988). Com exceção de *L. grayi* e *L. murrayi* todas são contaminantes de alimentos. *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e animais. (ROCOURT, 1989; BOERLIN et alii, 1991).

L. ivanovii é patogênica principalmente para animais sendo raramente isolada de fontes humanas.

3.1.2. MORFOLOGIA E CARACTERÍSTICAS CULTURAIS

L. monocytogenes apresenta forma de pequeno bastonete regular, com 0,4 a 0,5 μm de diâmetro e 0,5 a 2,0 μm de comprimento, extremidades arredondadas, podendo ocorrer isolada, em cadeias curtas ou as células podem estar arranjadas em ângulos formando V entre si ou ainda em grupos que se mantêm paralelos ao longo de um eixo. Em culturas mais velhas, filamentos de 6,0 a 20 μm ou mais em comprimento podem se desenvolver (SEELIGER & JONES, 1986).

É Gram positiva, mas em culturas velhas perde a habilidade em reter os corantes de Gram. Não forma cápsulas, nem esporos; móvel por flagelos peritricos quando cultivadas a 20-25°C, com movimento de tombamento ou rotatório (GRAY & KILLINGER, 1966), embora quando incubada entre 30 a 37°C ainda demonstre alguma motilidade (LOVETT, 1989).

É um microorganismo aeróbico ou facultativamente anaeróbico. As colônias com 24 horas em ágar nutriente tem diâmetro de 0,5 a 1,5 mm e apresentam-se de cor cinza azulada através de iluminação normal ou com brilho característico verde-azulado quando se utiliza luz obliquamente transmitida (SEELIGER & JONES, 1986). Em ágar sangue produz zona de B-hemólise causado por uma hemotoxina solúvel (SEELIGER, 1961).

Em meios semi-sólidos e incubação a 25°C apresenta crescimento em forma de guarda-chuva, 3 a 5mm abaixo da superfície (SEELIGER & JONES, 1986).

Multiplica-se em meio contendo 10% de NaCl ou bile (SEELIGER, 1961) e desenvolve-se numa faixa de temperatura entre 0,4 e 50°C (WALKER & STRINGER, 1987; JUNTILA et alii, 1988), sendo o ótimo entre 30 e 37°C (SEELIGER & JONES, 1986). O crescimento ocorre, preferencialmente, entre pH 6 e pH 9 (SEELIGER

& JONES, 1986), podendo se desenvolver em pH 5 conforme relatado por CONNER et alii (1986).

Poderá crescer em pH 4,4 a pH 4,6 em meio caldo tripticase soja, quando incubada perto da faixa ótima de temperatura e por tempo suficiente para superar a lag-fase (FARBER et alii, 1989; SORRELS et alii, 1989).

3.1.3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

L. monocytogenes é catalase positiva, oxidase negativa. Fermenta glicose, produzindo, principalmente ácido láctico. Dá teste positivo para vermelho de metila e Voges-Proskauer. Não utiliza citrato exógeno e não produz indol. Hidrolisa hipurato de sódio e esculina. Não hidrolisa uréia, gelatina e caseína. A reação CAMP teste é positiva com *Staphilococcus aureus* e negativa com *Rhodococcus equi* em ágar sangue de carneiro (SEELIGER & JONES, 1986).

O conteúdo de G+C no ADN é de 36-39 mol.%.

Dos testes bioquímicos, a fermentação da xilose e ramnose é essencial para a diferenciação das espécies de *Listeria* (LOVETT, 1987a). *L. monocytogenes* não fermenta xilose e manitol. A fermentação da ramnose é positiva.

No Quadro 1 temos a diferenciação tradicional das espécies de *Listeria*.

QUADRO 1 - Características bioquímicas das espécies de *Listeria*

Testa/substrato	monocytogene s	ivanovii	innocua	welshimeri	seeligeri	grayi	murray	dentrificans*
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	+	+
Ramnose	+	-	V	V	-	-	V	-
Xilose	-	+	-	+	+	-	-	+
Hidrólise hipurato	+	+	+	+	+	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Vermelho de Metia	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta-hemólise	+	+	-	-	V	-	-	-
Hidrólise de uréia	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução de nitrato	-	-	-	-	-	-	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S em TSI	-	-	-	-	-	-	-	-
CAMP pos/ <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-
CAMP pos/ <i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-

* Reclassificada como *Jonesia dentrificans*

V= Variável

Fonte: Adaptada de (GRAY & KILLINGER, 1966).

3.1.4. SOROTIPOS E FAGOTIPOS DE *L. monocytogenes*

PATERSON (1939, 1940) descreveu um método para sorotipagem de *Listeria* baseado nos antígenos somático (0) e flagelar (H) e juntamente com outros trabalhos de sorotipagem (DONKER - VOET, 1957; SEELIGER, 1961, SEELIGER & HONE, 1979), resultou em sete sorotipos, a saber 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c e 4b. A literatura lista ainda 4a, 4c, 4d, 4e, 4f, 4g, 5, 6 e 7 (RALOVICH, 1984; McLAUCHLIN, 1987).

De todos os sorotipos, apenas 1/2a, 1/2b e 4b tem sido associados com a doença em humanos (SCHUCHAT et alii, 1991), sendo que as cepas sorotipo 4b, são predominantes em surtos e casos esporádicos de listeriose de origem alimentar (McLAUCHLIN, 1990; FARBER & PETERKIN, 1991; SCHUCHAT et alii, 1991). Trabalhos recentes tem mostrado uma associação epidemiológica entre listeriose perinatal e sorotipos 1/2b, 3b e 4b (GELLIN et alii, 1991).

Desde a descoberta em 1945 (SCHULTZ, 1945) de fagos específicos para *Listeria spp.*, vários autores tem pesquisado o uso de fagotipos em *L. monocytogenes* (AUDURIER et alii, 1984; AUDURIER & MARTIN, 1989) e utilizado a fagotipagem em estudos de surtos de listeriose.

A fagotipagem é limitada pela baixa porcentagem de cepas tipáveis de sorotipo 1/2 e pela falta de fagos para os outros sorotipos (AUDURIER et alii, 1984; AUDURIER & MARTIN, 1989; ROCOURT & CATIMEL, 1989).

Segundo McLAUGHLIN (1987), somente 64% de sorotipos de *Listeria* podem ser tipados por bacteriófagos. Recentemente, uma nova série de fagos derivados de fontes ambientais e cepas lisogênicas tem sido descrita (LOESSNER & BUSSE, 1990).

3.2. HABITAT

Relatos sugerem que o habitat primário do microrganismo seja o solo e a vegetação onde tem existência *saprofítica*, podendo contaminar homem e animais através de várias rotas e várias fontes (WEIS & SEELIGER, 1975). Encontra-se amplamente disseminado no meio ambiente, estando presente em países de clima temperado e tropical.

O nicho ecológico de *L. monocytogenes* é difícil definir; o microrganismo é encontrado em solo cultivado ou não (WELSHIMER & DONKER-VOET, 1971; WEIS, 1975a; WEIS & SEELIGER, 1975; HOFER & POVOA, 1984), vegetação, silagem e forragem (WELSHIMER, 1968; WELSHIMER & DONKER-VOET, 1971; WEIS 1975 a, b; WEIS & SEELIGER, 1975; FENLON, 1986; SKOVGAARD & MORGEN, 1988); hortaliças para consumo humano (HOFER, 1975 a; STEINBRUEGGE et alii, 1988; HEISICK et alii, 1989, a, b), mamíferos domésticos e selvagens (GRAY & KILLINGER, 1966; WEIS 1975, b; WEIS & SEELIGER, 1975; HOFER, 1983; DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; COTTIN et alii, 1985; SKOVGAARD & MORGEN, 1988; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989), aves domésticas e silvestres (GRAY & KILLINGER, 1966; GREGÓRIO & EVELAND, 1975; KWANTES & ISAAC, 1975; WEIS, 1975 b; WEIS & SEELIGER, 1975; DIJKSTRA, 1978; FENLON, 1986; SKOVGAARD & MORGEN, 1988); peixes, crustáceos, mariscos e rãs (GRAY & KILLINGER, 1966), efluentes, tratados ou não, lodo de esgoto, água de rio (HOFER, 1975 b; KAMPELMACHER & NOORLE JANSEN, 1975; WATKINS & SLEATH, 1981; GEVENICH et alii, 1985) e de fezes de portadores humanos ou animais, aparentemente sadios (KAMPELMACHER & NOORLE JANSEN, 1972; DURST & BERENCSI, 1975; GREGÓRIO & EVELAND, 1975; MANEV et alii, 1975; KAMPELMACHER et alii, 1976; HOFER, 1983; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989).

Listeria monocytogenes também tem sido isolada de outras fontes como usinas processadoras de leite e produtos lácteos (SURAK & BAREFOOT, 1987; COX et alii, 1989) e indústrias processadoras de carnes (WATKINS & SLEATH, 1981; FLOWERS, *apud* MEAT, 1987; SKOVGAARD & MORGEN, 1988).

3.2.1. MODOS DE TRANSMISSÃO

A forma de transmissão da doença ao homem ainda não está bem estabelecida.

Embora alguns autores sustentem o conceito de transmissão zoonótica da listeriose (RALOVICH, 1984; HYSLOP & OSBORNE, 1959; MITSCHERLICH & MARTH, 1984, HIRD, 1987), a transmissão de animais para o homem raramente tem sido provada (WELSHIMER, 1981).

O grupo de trabalhos em listeriose de origem alimentar da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1988) afirma que a doença é transmitida por meios não zoonóticos. Segundo o grupo, *L. monocytogenes* é um microrganismo ambiental cuja forma fundamental de transmissão ao homem é através de alimentos contaminados durante a produção e processamento.

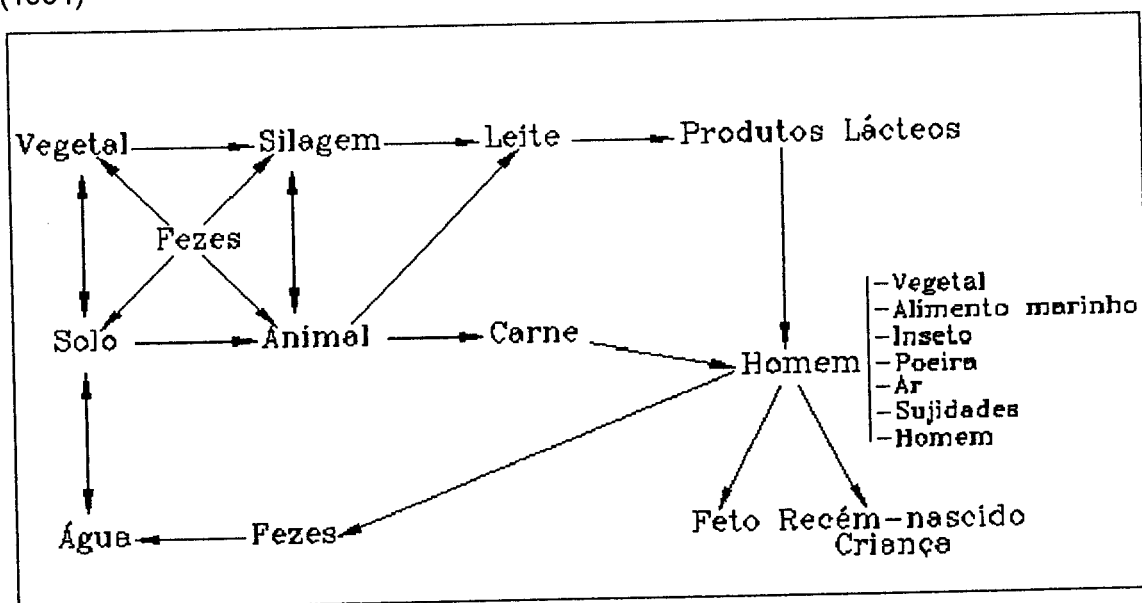
Experimentos em animais têm confirmado que uma das principais fontes de contaminação é o alimento. Surtos recentes em humanos têm sugerido a mesma forma de transmissão (CANADÁ, 1981 a,b; SCHLECH et alii, 1983; DAVIES et alii, 1984; SCHLECH & LAVIGNE, 1984; CDC 1985; FDA, 1985; FLEMING et alii, 1985; LISTERIOSIS, 1986; RECENT, 1986).

SEELIGER et alii (*apud* GRAY & KILLINGER, 1966) sugerem um possível ciclo de infecção no homem: * fezes humanas infectadas → contaminação do solo → contaminação de legumes e verduras por solo ou fezes contaminadas → infecção oral.* Para

ruminantes: * animal infectado → excreção de *L. monocytogenes* por fezes e urina → contaminação do solo, sobrevivência em estrume, poeiras, sujidades → propagação sob condições ambientais favoráveis, como silagem neutra ou alcalina (impropriamente fermentada) → infecção oral*.

Embora a origem e o modo de transmissão de todas as formas de listeriose seja complexo, (RYSER & MARTH, 1991), usando dados obtidos da literatura traçaram as várias rotas de infecção (Figura 1).

Figura 1 - Rotas de transmissão de *L. monocytogenes* segundo RYSER & MARTH (1991)



3.3. *Listeria monocytogenes* EM ALIMENTOS

3.3.1. OCORRÊNCIA

Listeria monocytogenes tem sido isolada de uma grande variedade de alimentos, tais como: leite cru (DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1985; LOVETT et alii, 1987 b; LIEWEN & PLAUTZ, 1988; FARBER et alii, 1987; FARBER et alii, 1988 a; SLADE et alii, 1988; FENLON & WILSON, 1989), leite pasteurizado (FERNANDEZ GARAYZABAL et alii, 1986), queijos de diversos tipos (TERPLAN et alii, 1986; BECKERS et alii, 1987; COMI et alii, 1987; FARBER et alii, 1987; BREER & SCHOPFER, 1988; CANTONI et alii, 1988 a; CANTONI et alii, 1988 b; COMI & CANTONI, 1988; GILBERT & PINI, 1988 ; PINI & GILBERT, 1988 b; DESTRO, 1990), carnes e derivados (DURST & BERENCSI, 1975; KWANTES & ISSAC, 1975; GITTER, 1976; COMI & CANTONI, 1985; NICOLAS, 1985; FLOWERS (apud MEAT, 1987); BREER & SCHOPFER, 1988; CANTONI et alii, 1988 b; KARCHES & TEUFEL 1988; McCLAIN & LEE, 1988; PINI & GILBERT, 1988 a; SCHIMDT et alii, 1988; SKOVGAARD & MORGEN, 1988; TRUSCOTT & McNAB, 1988; BUCHANAN et alii, 1989; SKOVGAARD & NORRUNG, 1989; LEISTNER et alii, 1989; SCHIMDT, 1989; DESTRO, 1990)

O microrganismo também tem sido isolado de outros alimentos como verduras, legumes, produtos marinhos e alimentos prontos para consumo.

3.3.2. RESISTÊNCIA TÉRMICA EM ALIMENTOS

A *L. monocytogenes* é considerada como sendo mais termorresistente do que outras bactérias não esporuladas (MACKEY & BRATCHELL, 1989; MACKEY et alii, 1990).

Embora se tenham poucas informações da sua sobrevivência durante o processamento térmico em produtos cárneos (MACKEY & BRATCHELL, 1989; BOYLE et alii, 1990; JOHNSON et alii, 1990; MACKEY et alii, 1990), estudos detalhados tem sido executados durante a pasteurização em produtos lácteos (MACKEY & BRATCHELL, 1989; KNABEL et alii, 1990; MACKEY et alii, 1990; PEARSON & MARTH, 1990).

Vários estudos tem sido feitos em leite, mas as opiniões são bastante controvertidas. Alguns autores afirmam ser *L. monocytogenes* resistente à pasteurização (BEARNS & GIRARD, 1958; BRYAN, 1979; FERNANDEZ GARAYZABAL et alii, 1986; DOYLE et alii, 1987; FERNANDEZ GARAYZABAL et alii, 1987) e a outros tratamentos térmicos (KARAIOANNOGLOU & XENOS, 1980), outros dizem o contrário (OBIGER, 1976; BRADSHAW et alii, 1985; BUNNING et alii, 1986; DONNELLY & BRIGGS, 1986; DONNELLY et alii, 1987; BRADSHAW et alii, 1987; BECKERS et alii, 1987; BUNNING et alii, 1988; FARBER et alii, 1988 b).

Os resultados conflitantes podem ser explicados pela diferença de métodos, meio de suspensão, tamanho do inóculo e linhagem utilizados pelos diferentes autores, tanto no teste de aquecimento quanto na recuperação do microrganismo.

Os primeiros estudos foram feitos em leite (BEARNS & GIRARD, 1958), onde há o relato da sobrevivência de *L. monocytogenes* à pasteurização (61,7°C por 35 min.). DONNELLY et alii (1987) e BECKERS et alii (1987), repetindo o experimento de BEARNS & GIRARD, verificaram que o método de "tubos abertos"

utilizado, ou testes similares, podem levar a valores de resistência térmica imprecisos.

Segundo DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii (1985), a resistência térmica de *Listeria* à pasteurização pode ser explicada pela alta contaminação inicial do produto. FLEMING et alii (1985) e DOYLE et alii (1987) explicam que a resistência à pasteurização seria pela natureza intracelular facultativa da listeria que a protegeria da inativação térmica.

BUNNING et alii (1986) estudaram a resistência térmica de *L. monocytogenes*, utilizando bactérias localizadas no interior de fagócitos de camundongos e suspensas em leite cru e obtiveram um valor D a 71,7°C de 1,9s, afirmando que a posição intracelular não as protegia da inativação térmica.

DOYLE et alii (1987) usando o leite de várias vacas infectadas artificialmente sugeriram que *L. monocytogenes* resiste ao tratamento térmico mínimo (71,7°C por 15s) recomendado pelo "Food and Drug Administration", quando em posição intracelular.

Posteriormente, BUNNING et alii (1988) observaram não existirem diferenças significativas entre a resistência térmica de listerias suspensas livremente no leite ou localizadas intracelularmente em fagócitos de bovinos; constataram que a posição intracelular não protege *L. monocytogenes* durante a pasteurização, mas que a resistência térmica do microrganismo sugere que se houver inóculo grande pode haver sobrevivência às condições de pasteurização a alta temperatura por período curto (HTST).

Estudos atuais têm revelado que, se *L. monocytogenes* é exposta a temperaturas sub-letais ao redor de 44 a 48°C antes de ser submetida a temperatura final do teste, a bactéria tem um aumento na termorresistência (FEDIO & JACKSON, 1989; BUNNING et alii, 1990; FARBER & BROWN, 1990; KNABEL et alii, 1990; LINTON et alii, 1990; FARBER et alii, 1992).

Para BUNNING et alii (1992), o efeito do choque térmico a 48°C por 15 minutos na termorresistência de *L. monocytogenes* submetida a alta temperatura por período curto (HTST) não foi significativa. Entretanto, FARBER et alii (1992) encontraram significativas diferenças na termorresistência de *L. monocytogenes*

crescidas a 30, 39 e 43°C. As células crescidas a 39 e 43°C foram capazes de sobreviver à pasteurização a alta temperatura por período curto, ao contrário das crescidas a 30°C que não sobreviveram.

Segundo FARBER et alii (1992), é possível que produção de proteínas "heat-shock" pela *L. monocytogenes* e/ou aumento de viscosidade da membrana bacteriana seja responsável pelo aumento da resistência térmica quando a bactéria cresce a altas temperaturas.

Recentemente, descobriu-se que técnicas anaeróbicas utilizadas na recuperação de *L. monocytogenes* injuriadas pela alta temperatura são mais eficientes do que as técnicas utilizadas em presença do oxigênio (KNABELL et alii, 1990). FARBER & PETERKIN, (1991), afirmam que esta descoberta e o fenômeno choque térmico podem ajudar a explicar algumas controvérsias encontradas na literatura em relação à termorresistência de *L. monocytogenes*.

3.3.3. SOBREVIVÊNCIA DE *L. monocytogenes* DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM DE ALIMENTOS

A capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver nas condições mais adversas no alimento, a habilidade de crescer a temperaturas de refrigeração, tem levado diversos pesquisadores a estudar o seu comportamento durante o processamento e estocagem de produtos, principalmente entre produtos lácteos.

Nos estudos da sobrevivência dessa bactéria durante a maturação e a estocagem de vários tipos de queijos, observou-se que, na maioria dos casos, *L. monocytogenes* permaneceu no queijo por períodos de pelo menos 60 dias (DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1987), chegando até mesmo a 140 dias para o queijo tipo "colby" (YOUSEF & MARTH, 1988) ou de 224 até 434 dias para o queijo tipo "cheddar" (RYSER & MARTH, 1987 a).

SIPKA et alii (1974) também demonstraram a persistência e mesmo a multiplicação de *L. monocytogenes* durante o período de maturação de certos queijos frescos preparados com leite contaminado.

A sobrevivência de *L. monocytogenes* também tem sido verificada em queijo tipo "camembert" (RYSER & MARTH, 1987 b); queijo semi-duro de leite de cabra (THAM, 1988); processamento e maturação do queijo tipo "brick" (RYSER & MARTH, 1989).

DOYLE et alii (1985) estudando a sobrevivência de *L. monocytogenes* em leite em pó, relatam a sua presença por até 12 semanas. *L. monocytogenes* sobrevive ainda ao processamento e armazenamento de manteiga (OLSEN et alii, 1988); em leite fermentado refrigerado e em iogurte desnatado (SCHAACK & MARTH, 1988); em leiteiro ("buttermilk") e iogurte integral aromatizado ou não (CHOI et alii, 1988).

Em produtos cárneos, KHAN et alii (1975) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em carne de cordeiro e carne bovina moída (mantidas a 0°C por 24 e 20 dias respectivamente).

Em carne moída armazenada a 4°C, (JOHNSON et alii, 1988) verificaram que o microrganismo permaneceu viável por 2 semanas, ou segundo SHELEF (1989) por até 30 dias. Carne moída estéril foi inoculada com *L. monocytogenes* juntamente com uma variedade de microrganismos e estocada a 8°C por 17 dias (GOUET et alii, 1978). Na ausência de microrganismos competitivos, ocorria uma queda inicial na população ficando a seguir estável.

Na presença de *Lactobacillus plantarum*, o número de *Listeria* também diminuía. Mas com flora mista, após um decréscimo, o número de *Listeria* aumentou a um nível maior que o inicial. Estes resultados não puderam ser comprovados por SHELEF (1989) que, mesmo deixando a carne deteriorar-se, não verificou um incremento na população de *Listeria*.

Muitos outros produtos podem permitir a sobrevivência e/ou crescimento de *L. monocytogenes*, tais como embutidos, produtos processados em calor seco ou úmido embalados a vácuo ou em filme permeável a oxigênio.

3.3.4. SURTOS DE LISTERIOSE DE ORIGEM ALIMENTAR

Diversos surtos de listeriose já foram documentados (Jena, Alemanha, 1954; Bremem, Alemanha, 1960-1961; Halle, Alemanha, 1966; Anjou, França, 1975-1976, e outros, *apud* *FOODBORNE LISTERIOSIS*, 1990), sem a comprovação real de que as fontes de infecção tenham sido alimentos contaminados. Entretanto, isto ficou claro em 1979, quando 20 pessoas em Boston, EUA, desenvolveram listeriose presumivelmente devido a ingestão de alface, tomate e salsa crua (LISTERIOSIS, 1986; HO et alii, 1986; KVENBERG, 1988).

No ano de 1981, um surto nas províncias marítimas do Canadá, resultou 41 casos de listeriose e 18 mortes; 83% dos casos foram perinatais (BROOME, 1986). O surto foi associado com o consumo de salada tipo "coleslaw" produzida com repolho cultivado em terreno fertilizado com adubo de ovelhas procedentes de rebanho infectado (CANADÁ, 1981 a, b; SCHLECH et alii, 1983; SCHLECH, 1984).

Em 1983, em Massachusetts, EUA, o consumo de leite pasteurizado integral e pasteurizado com 2% de gordura causaram o surto que envolveu 49 casos de listeriose com 14 mortes, embora esses leites tivessem sido aparentemente pasteurizados em condições adequadas (FLEMING et alii, 1985).

Queijos macios tipo "mexicano" estiveram diretamente implicados no surto que houve em 1985, na Califórnia, EUA. O problema deve ter ocorrido possivelmente devido a mistura de leite cru com leite pasteurizado na produção de queijos (LISTERIOSIS, 1986) e/ou contaminação pós-pasteurização (SILLIKER, 1986). Não se sabe exatamente o número de casos e de mortes neste surto; fala-se em 86 casos e 29 mortes (CDC, 1985); 100 casos e 39 mortes (SILLIKER, 1986); 150 casos e 84 mortes (RECENT, 1986) e 142 casos e 47 mortes (USA, 1987).

Outros três surtos teriam ocorrido nos EUA, segundo SILLIKER (1986). O primeiro em 1985 devido ao consumo de queijo

tipo "liederkranz". O segundo e o terceiro em 1986, causado por queijo tipo "brie" francês e tipo "mexicano" respectivamente.

Em alguns surtos não se conseguiu estabelecer epidemiológica e/ou microbiologicamente as fontes comuns, como os ocorridos na Dinamarca em 1986 (WHO, 1988), os de 1987 na Pennsylvania, EUA (EUA, 1987) e na Philadelphia, EUA (WHO, 1988); e o de 1988 na Escócia (CAMPBELL, 1989).

Além dos surtos mencionados, casos esporádicos de listeriose de origem alimentar tem ocorrido, conforme relatos de (BANNISTER, 1987; KVENBERG, 1988; SCHWARTS et alii, 1988; KERR et alii, 1988 b; SVABIC et alii, 1988; KACZMARSKI & JONES, 1989; JUNTILA & BRANDER, 1989 e FARBER et alii, 1990).

3.3.5. MÉTODOS DE DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

A detecção de *L. monocytogenes* em alimentos tem sido realizada através do uso de diferentes métodos, sendo que os meios de cultura de enriquecimento e de isolamento possuem variações segundo diferentes autores.

Embora o plaqueamento direto das diluições da amostra possa ser utilizado (BUCHANAN et alii, 1987; YOUSEF et alii, 1988; GOLDEN et alii, 1988 a; SCHMIDT, 1989), o enriquecimento anterior ao plaqueamento em ágar seletivo tem sido bastante difundido, principalmente quando se pretende recuperar células injuriadas ou quando as células estão presentes em baixo número na amostra (DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; DOYLE & SCHOENI, 1986; LOVETT, 1987 a; SLADE & COLLINS - THOMPSON, 1987; McCLAIN & LEE, 1988; SCHMIDT, 1989).

Tem sido bastante eficiente no isolamento de *L. monocytogenes* de origem alimentar o uso de um meio de enriquecimento pouco seletivo, seguido de um meio de enriquecimento secundário seletivo e isolamento em ágar diferencial (WHO, 1988; RALOVICH, 1989).

Incubando-se o caldo de enriquecimento a 4°C, pode-se suprimir a flora acompanhante (RALOVICH, 1975; DOMINGUEZ RODRIGUEZ et alii, 1984; YOUSEF et alii, 1988); este método pode levar alguns meses, pois a esta temperatura a listeria se multiplica vagorosamente, com um tempo de geração de 1,5 dias (ROSENOW & MARTH, 1987).

Recentemente, a incorporação de agentes seletivos específicos dentro do meio de enriquecimento tem encurtado o tempo requerido para o isolamento de *L. monocytogenes*. Tem sido proposto o uso de agentes seletivos como o telurito de potássio, ácido nalidíxico e acriflavina (DONELLY, 1988), e o emprego de temperaturas mais altas como por exemplo 30°C (LOVETT, 1987 a; McCLAIN & LEE, 1988; SCHMIDT, 1989). A incubação do caldo de enriquecimento e das placas de isolamento pode ser feita em aerobiose ou microaerofilia.

A necessidade de um procedimento que seja eficiente no isolamento de células de *L. monocytogenes* a partir de alimentos tem levado muitos autores a comparar a efetividade das diversas metodologias propostas (HAYES et alii, 1986; HAO et alii, 1987; FLORIDA, 1987; PINI & GILBERT, 1988 b; GOLDEN et alii, 1988 b; HARTMANN et alii, 1988; TRUSCOTT & McNAB, 1988; LOESSNER et alii, 1988; HEISICK et alii, 1989a; BUCHANAN et alii, 1989; CASSIDAY et alii, 1989; RALOVICH, 1989; DESTRO, 1990.).

Dentre as metodologias descritas, o "método da FDA" desenvolvido por LOVETT (1987 a) para leite e produtos lácteos e o "método do USDA-FSIS" desenvolvido por McCLAIN & LEE (1988) para carnes e produtos cárneos parecem ser os mais bem aceitos.

Tem sido constatado que o procedimento recomendado pelo USDA-FSIS é mais eficiente que o método da F.D.A., até mesmo para produtos lácteos "Florida Department of Agriculture and Consumer Services" (*apud*, FLORIDA, 1987).

BRACKETT & BEUCHAT (1989) afirmam ainda que este método é mais sensível, principalmente quando se tem uma grande microbiota acompanhante. Além disso, o menor período requerido para o caldo de enriquecimento permite mais rapidamente o estabelecimento de um diagnóstico final.

Os testes de identificação e confirmação são normalmente baseados nas características clássicas descritas por SEELIGER & JONES (1986). A identificação inicial consiste no exame de morfologia colonial e celular, reação hemolítica em ágar sangue e exame através de iluminação transmitida para verificar a típica coloração verde azulada das colônias.

Métodos mais modernos como o Ensaio Imunoenzimático ("ELISA") usando anticorpos monoclonais para antígenos flagelares e a hibridização de ADN tem sido utilizados por alguns autores para identificação mais rápida e eficiente de *L. monocytogenes*. (FARBER & SPEIRS, 1987)

3.4. LISTERIOSE EM MAMÍFEROS, AVES, CRUSTÁCEOS E PEIXES

A listeriose em animais pode apresentar-se sob diversas formas. Em ruminantes, a doença é mais comumente caracterizada por encefalites, afetando animais de todas as idades, de ambos os sexos, com morbidade e letalidade variáveis (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987; PRENTICE & NEAVES, 1988). Outras manifestações clínicas incluem depressão, perturbação seguida da perda de coordenação, paralisia facial e dos músculos da garganta e da língua, salivação intensa e dificuldade de deglutição (USA, 1987). Os animais apresentam ainda mastites, podendo secretar o microrganismo no leite (SIPKA et alii, 1974), abortos e mortes perinatais (DONKER-VOET, 1966; GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987; PRENTICE & NEAVES, 1988).

Nos monogástricos, como também cordeiros e bezerros cujo rumem não está bem desenvolvido, ocorre também a encefalite, mas a síndrome mais comum é a septicemia (GRAY & KILLINGER, 1966; PRENTICE & NEAVES, 1988). Cães selvagens ou domésticos, gatos e coelhos também podem ser infectados (USA, 1987).

Aves domésticas e silvestres jovens são mais susceptíveis que os adultos e a doença usualmente se manifesta como septicemia. Podem apresentar também encefalite semelhante à dos ruminantes (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987).

Os crustáceos provavelmente não são infectados por *L. monocytogenes*, mas podem ser portadores e responsáveis pela disseminação do microrganismo. Já os peixes parecem ser mais susceptíveis à infecção (GRAY & KILLINGER, 1966; USA, 1987).

3.5. LISTERIOSE HUMANA

Em humanos, a listeriose acomete principalmente mulheres grávidas e seus fetos, crianças, idosos e indivíduos imunodeficientes (BLUME, 1987; USA, 1987; MARTH, 1988; WHO, 1988; MARTH & RYSER, 1990; RYSER & MARTH, 1991; EL-GAZZAR & MARTH, 1991), embora indivíduos aparentemente são também possam ser acometidos (NIEMAN & LORBER, 1980; SKIDMORE, 1981; LINNAN et alii, 1988.)

A doença usualmente se manifesta como meningite ou meningoencefalite, podendo estar associada a septicemia (USA, 1987). Outras manifestações são a septicemia de baixo grau em mulheres grávidas, semelhante a gripe; septicemia no período perinatal; síndrome semelhante à mononucleose; pneumonia; endocardite; abscessos localizados, internos ou externos; lesões cutâneas pustulares ou papulares; conjuntivite; uretrite, retardamento mental em crianças; psicose em adultos; septicemia em adultos, com otite, faringite, amigdalite e sinusite (GRAY & KILLINGER, 1966; MARTH, 1988).

As condições que tem sido identificadas como fatores predisponentes incluem o câncer, a cirrose, colite ulcerativa, bronquite asmática e doenças pulmonares crônicas obstrutivas, pênfigos, diabetes melito, transplantes, hemodiálises, gravidez, vício em

narcótico, uso de anti-ácidos afetando a acidez estomacal (USA, 1987; MARTH, 1988; WHO, 1988).

A doença é sub-relatada em todo o mundo, sendo que a taxa de mortalidade em casos diagnosticados varia entre 20 e 30% (DAVIES et alii, 1984; USA, 1987; TWEDT, 1988; LOVETT & TWEDT, 1988).

A taxa de seres humanos portadores é estimada em 5%, variando de 1 a 10% (USA, 1987; LOVETT & TWEDT, 1988), e o período de incubação para adultos é sugerido de uma a algumas semanas (WHO, 1988).

A dose infecciosa de *L. monocytogenes* para seres humanos ainda não foi determinada; provavelmente deve estar relacionada com a susceptibilidade do hospedeiro (WHO, 1988).

Em camundongos verificou-se que a injeção intraperitoneal de 10^2 unidades formadoras de colônias pode causar infecção e a Dose Letal Média (DL_{50}) é de 10^7 UFC (USA, 1987; ENGEL et alii, 1990).

Somente um surto de listeriose humana em que a análise do veículo foi completada, encontrou-se 10^3 a 10^5 Unidades Formadoras de Colônias por grama de alimento (UFC/g); baseado neste resultado, estimou-se que 10^3 a 10^5 UFC/g são necessários para infectar indivíduos susceptíveis e doses mais altas para causar infecção em indivíduos saudáveis (USA, 1987; ENGEL et alii, 1990).

FARBER & PETERKIN (1991), relatam a doença em indivíduos imunocompetentes após a ingestão de 10^6 a 10^9 células.

3.5.1. MECANISMO DA PATOGENICIDADE

L. monocytogenes é um microrganismo de natureza intracelular facultativa, com capacidade de parasitar e se multiplicar em macrófagos (MACKNESS, 1962) e em outras células hospedeiras (HAVEL, 1986; GAILLARD et alii, 1986, 1987; BERCHE et alii, 1987; COSSART et alii, 1989; BIELECKI et alii, 1990; CONLAN & NORTH,

1992), o que o diferencia da maioria dos microrganismos causadores de toxinfecção alimentar.

Os fagócitos monucleares têm um papel importante na destruição de *Listeria* no organismo. Macrófagos derivados dos monócitos do sangue circulante migram para o local da lesão, tomando-se estruturados na forma de granulomas visando controlar o número de bactérias (MIELKE et alii, 1988).

Várias investigações evidenciam que a formação do granuloma representa *conditio sine qua non* para a efetiva proteção do organismo contra *Listeria* (HAHN & NÄHER, 1985; NÄHER et alii, 1985a; NÄHER et alii, 1985b).

Os responsáveis pela ativação de macrófagos e formação desse granuloma são os linfócitos-T que liberam linfocinas, agora denominadas, δ -interferon (δ -INF) (MIELKE et alii, 1988).

Conseqüentemente, a disfunção em macrófagos e no sistema linfócitos-T, poderiam ser fatores predisponentes de listeriose no homem.

Estudos experimentais (OSEBOLD & INOUE, 1954, a, b) e recentes surtos humanos causados por alimentos contaminados (SCHLECH et alii, 1983; FLEMING et alii, 1985) sugerem o trato gastrointestinal como sendo a principal rota de entrada da bactéria (GAILLARD et alii, 1987; COSSART et alii, 1989). A bactéria invadiria as células epiteliais do intestino, onde já começaria a se multiplicar antes de ser internalizada pelos macrófagos (RACZ et alii, 1970; RACZ et alii, 1972). Segundo DONALD & CARTER (1980), *L. monocytogenes* atravessaria a barreira intestinal através das células "Peyer's patches" e começaria a multiplicação após ter sido fagocitada pelos macrófagos.

Em recente trabalho, usando células epiteliais do intestino Caco-2, GAILLARD et alii (1987) demonstraram que após a internalização pela célula hospedeira, a bactéria é imediatamente incorporada dentro do fagolisossomo para em seguida escapar para o citoplasma e se multiplicar.

Dentro do citoplasma, filamentos actínicos (F-actina) se reorganizam formando uma longa cauda no fim da bactéria (TILNEY & PORTNOY, 1989; MOUNIER et alii, 1990), que a impulsiona através

do citoplasma para formar projeções na superfície da célula, penetrando desta maneira em células adjacentes não infectadas (TILNEY & PORTNOY, 1989; MOUNIER et alii, 1990).

Após se disseminar de célula a célula no tecido hospedeiro, formando abscessos e focos de infecção no fígado e baço, *L. monocytogenes* cria passagem através do epitélio capilar ganhando acesso a órgãos alvos como placenta e sistema nervoso central, incluindo o cérebro, (MENGAUD et alii, 1991) causando assim aborto e sintomas característicos de meningoencefalites .

3.5.2. FATORES DE VIRULÊNCIA

Embora não se conheçam exatamente todos os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade de *L. monocytogenes*, vários estudos tem indicado que a virulência deste organismo é multifatorial.

A virulência pode estar relacionada com temperatura de cultivo da bactéria. Cepas crescidas a temperaturas reduzidas (4°C) tem sido descritas como sendo mais virulentas (GIRARD et alii, 1963; DURST, 1975; WOOD & WOODBINE, 1979; CZUPRYNSKI et alii, 1989). Este fenômeno pode aumentar a virulência do organismo em produtos refrigerados.

Dentre os vários fatores incriminados como responsáveis pela virulência de *L. monocytogenes*, a hemolisina tem sido considerado o mais importante (ROCOURT & SEELIGER, 1987; COSSART & MENGAUD, 1989). Cepas da bactéria mutantes não hemolíticas se mostraram completamente avirulentas (GAILLARD et alii, 1986; KATHARIOU et alii, 1987; PORTNOY et alii, 1988; COSSART et alii, 1989).

O papel mais provável desta hemolisina é lisar os fagolisossomos contendo as bactérias liberando-as no citoplasma, pois, cepas mutantes desenvolvidas de *L. monocytogenes*, hemolisinas negativas, são usualmente encontradas dentro do hospedeiro, sendo

incapazes de crescer intracelularmente (GAILLARD et alii, 1987; KUHN et alii, 1988; PORTNOY et alii, 1988; CAMILLI & PORTNOY, 1988). Os resultados que mais suportam esta hipótese foram obtidos pela introdução do gene *hlyA* em *Bacillus subtilis*, os quais passaram a produzir hemolisina e foram capazes de crescer intracelularmente (BIELECKI et alii, 1990).

Desde a demonstração da existência de uma hemolisina extracelular de *L. monocytogenes* por HARVEY & FABER (1941), vários autores tem tentado isolá-la e caracterizá-la (NJOKU-OBI et alii, 1963; JENKINS et alii, 1964; SIDDIQUE et alii, 1974; SMITH & DUNCAN, 1978; GOEBEL et alii, 1988; COSSART, 1988).

Mais recentemente GEOFFROY et alii (1987), purificaram esta hemolisina, designada listeriolisina O. É uma proteína extracelular de massa molecular 58 kDa, pertencente ao grupo citolisina sulfidril-ativado; portanto a atividade lítica é inibida por pequenas quantidades de colesterol e agentes oxidantes. É ativada por agentes redutores e análoga antigenicamente a estreptolisina O.

Vários relatos indicam que *L. monocytogenes* produz uma ou mais hemolisinas distintas de listeriolisina O. PARRISIUS et alii (1986) identificaram uma toxina que apresenta reação cruzada com estreptolisina O e propuseram a denominação de α -listeriolisina, e uma outra proteína de 23 kDa que não é SH - ativada e não apresenta reação cruzada com estreptolisina O (β - listeriolisina) provavelmente responsável pela reação CAMP típica de *L. monocytogenes*.

De acordo com alguns autores, a transcrição de *hlyA*, gene ativador da hemolisina, é controlado pelo gene *prfA* de *L. monocytogenes* (LEIMEISTER - WÄCHTER et alii, 1990; MENGAUD et alii, 1991; FREITAG et alii, 1992; PORTNOY et alii, 1992). Cepas mutantes, com o gene *prfA* inativado, bloqueiam a ação não somente de *hly* mas também de genes que codificam as atividades de duas fosfolipases que podem potencializar a habilidade de listeriolisina romper as membranas da célula do hospedeiro (CAMILLI et alii, 1991; GEOFFROY et alii, 1991; LEIMEISTER - WÄCHTER et alii, 1991; MENGAUD et alii, 1991).

Embora a hemolisina seja requerida para a sobrevivência intracelular de *L. monocytogenes* a entrada inicial do organismo dentro

da célula hospedeira parece não depender de listeriolisina O (KATHARIOU et alii, 1987; KUHN et alii, 1988).

KUHN & GOEBEL (1989) identificaram uma proteína extracelular de massa molecular de 60 kDa (p 60) que provavelmente estaria envolvida nesta entrada inicial.

Mais recentemente, GAILLARD et alii (1991) identificaram um gene *inIA*, que codifica a internalina, uma proteína de 80 kDa responsável pela entrada da bactéria em células epiteliais.

Outra proteína possivelmente envolvida na virulência de *L. monocytogenes* é o fosfatidilinositol - específico Fosfolipase C, cujo papel no crescimento bacteriano ou patogenicidade ainda não está definido (CAMILLI et alii, 1991; NOTERMANS et alii, 1991).

Além desses fatores, componentes da parede celular incluindo peptidoglicam, ácido teicóico e lipoteicóico (FIEDLER, 1988) também parecem influenciar a virulência da bactéria. Em estudos realizados, peptidoglicam, foi diretamente responsável pela resistência de *L. monocytogenes* à lisosima, a qual contribui para a sua sobrevivência dentro de macrófagos (GALSWORTHY, 1987).

Tem sido reconhecido também que cepas rugosas de *L. monocytogenes* são bem menos virulentas do que cepas lisas; a composição protéica da parede celular de cepas rugosas parece ser diferente das cepas lisas (HOF, 1984).

Existem muitos outros fatores que possivelmente estão envolvidos na virulência da bactéria, como a presença de ferro. A síntese de listeriolisina O aumenta "in vitro" com o declínio da concentração de Fe no meio de crescimento. Talvez "in vivo" este fenômeno resulte no aumento de lise de eritrócitos como uma fonte de ferro (COWART, 1987; GEOFFROY et alii, 1987).

A virulência de *L. monocytogenes* também pode estar relacionada com a produção de várias espécies de oxigênios tóxicos. GODFREY & WILDER (1985) demonstraram que cepas virulentas produzindo maiores quantidades de peróxido de hidrogênio e ânion superóxide sobreviveram mais tempo em macrófagos de camundongo do que cepas avirulentas que produziram menor quantidade desses oxigênios. Esses relatos, segundo GALSWORTHY (1987), sugerem que as cepas virulentas podem produzir quantidades suficientes de

catalase e superóxide dismutase para atuar em fatores bactericidas similares dentro de fagócitos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. CEPAS DE *Listeria monocytogenes*

Foram utilizadas sete cepas de *L. monocytogenes*, sendo três isoladas de alimentos, a padrão patogênica Scott A, obtidas da Faculdade de Engenharia de Alimentos, FEA Unicamp, e três isoladas de casos clínicos humanos obtidas da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. Foi também utilizada uma cepa de *L. innocua*, obtida da FEA Unicamp, como padrão não patogênica. Essas cepas estão relacionadas na Quadro 2.

QUADRO 2 - Cepas de *Listeria* utilizadas no estudo

Cepas	Identificação
<i>L. monocytogenes</i> - Scott A	Padrão patogênica
<i>L. monocytogenes</i> - HSE	isolada de líquido céfalo-raquidiano (LCR)
<i>L. monocytogenes</i> - Ar/80	isolada de hemocultura
<i>L. monocytogenes</i> - 600.309-G	isolada de LCR
<i>L. monocytogenes</i> - 78	isolada da lingüiça
<i>L. monocytogenes</i> - 60	isolada de salsicha
<i>L. monocytogenes</i> - 132	isolada de salsicha
<i>L. innocua</i>	padrão não patogênica

4.1.2. CÉLULAS VERO

Originalmente obtidas do Centro Panamericano de Febre Aftosa, foram mantidas pelo Setor de Cultura de Células do Laboratório de Referência Animal do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária - LARA Campinas, Estado de São Paulo.

4.1.3. MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Foram coletados da cavidade abdominal de camundongos de 8 a 12 semanas de idade, fêmeas, brancas suíças, pertencentes à linhagem P, originárias do "Institute for Animal Health", Pirbright Laboratories, Inglaterra, criadas e mantidas no Lara Campinas, Estado de São Paulo.

4.1.4. OVOS EMBRIONADOS

Foram utilizados ovos embrionados de galinha com 11 dias de incubação, todos de casca branca, obtidos de incubatório de granja comercial.

4.1.5. MEIOS DE CULTURA

- Ágar soja tripticase, da Difco, adicionado de 0,6% de extrato de levedura, da Merk (TSA-YE).
- Ágar triptose, da Difco, adicionado de ácido nalidíxico, da Sigma (ATN).
- Ágar colúmbia, da Merk, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de cavalo.
- Ágar colúmbia, da Merk, adicionado de 5% de sangue desfibrinado de cobaia.
- Ágar tríplice açúcar ferro (TSI), da Difco.
- Caldo soja tripiticase, da Difco, adicionado de 0,6% de extrato de levedura, da Merk (TSB-YE).
- Meio Mínimo Essencial, da Difco, adicionado de 10% de soro fetal bovino, da Cultilab.
- Caldo nitrato, da Difco.
- Caldo VM-VP, formulado no laboratório.
- Caldo vermelho de fenol-base adicionado de xilose a 5%.
- Caldo vermelho de fenol-base adicionado de manitol a 10%.
- Caldo vermelho de fenol-base adicionado de ramnose a 5%.

4.1.6. REAGENTES E SOLUÇÕES

- Solução a 2% de ácido nalidíxico, Sigma.
- Solução alcoólica a 5% de alfa-naftol, Vetec.
- Solução a 0,5% de alfa-naftilamina, Merk.

- Solução a 0,8% de ácido sulfanílico, Merk.
- Solução de sulfato de gentamicina a 50 µg.
- Solução tampão de salina fosfato (PBS) adicionado de 8% de soro fetal bovino.
- Triton X-100 a 1%, Quimibrás.
- Metanol p.a., Merk.
- Solução de Giemsa, Merk.
- Solução May-Grunwald, Merk.
- Solução de cristal violeta fenicada, Merk.
- Solução a 40% de hidróxido de sódio.
- Solução a 0,4% de azul Tripan, Gibco.

4.1.7. EQUIPAMENTOS

- Incubadora de ovos, da Mibo.
- Estufa incubadora, da Quimis, modelo 316.
- Conta-colônias, da Biomatic.
- Centrífuga refrigerada, da International, modelo PR-6.
- Fluxo laminar, da Veco, modelo VLFS-12.
- Iluminador "Schott", modelo KL 1500.
- Espelho côncavo "Nikon" SMZ-2.
- Microscópio binocular, da "Leitz Wetzlar".

4.2. MÉTODOS

4.2.1. CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DE *L. monocytogenes*

Trabalhamos com dois tipos de cepas: as isoladas a partir de casos clínicos humanos e pertencentes ao sorotipo 4 b, e as isoladas a partir de alimentos, pertencentes ao sorotipo 1/2 b (cepa 78) e ao sorotipo 1/2 a (cepas 60 e 132).

Todas as cepas recebidas foram submetidas a testes preliminares de pureza e caracterização antes de serem utilizadas nos experimentos. Foram semeadas em estrias em placas contendo ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN) e após incubação a 30°C, foram examinadas sob luz transmitida.

A partir de colônias isoladas obtidas através de técnicas de transluminação, segundo McCLAIN & LEE (1988), e repicadas em caldo soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE), realizaram-se as provas de morfologia e coloração de Gram e motilidade para visualização de movimento característico do microorganismo. Para a realização deste teste colocou-se uma gota de cultivo em lâmina própria para teste de gota pendente, foi sobreposta uma lâmina e observou-se em microscópio de contraste de fase.

A prova de catalase foi realizada a partir da semeadura das cepas em ágar soja tripticase acrescentado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE). Retirou-se com uma alça de platina uma pequena quantidade de cultivo que foi depositada numa lâmina onde foram adicionadas gotas de peróxido de hidrogênio a 3 volumes para se verificar a formação ou não de borbulhas.

Semeaduras em estrias foram feitas em placas de ágar sangue de cavalo e cabaia para se verificar após incubação a 35°C durante 36 horas, a presença ou não de β -hemólise. O ágar sangue foi preparado com uma camada de ágar base Colúmbia.

Provas bioquímicas complementares também foram realizadas. A partir dos cultivos em TSA-YE inocularam-se em caldos de fermentação de carboidratos.

A produção de ácidos a partir de glicose, lactose e sacarose foram verificadas, semeando-se as amostras em ágar tríplice açúcar ferro (TSI).

Semearam-se também os cultivos de TSA-YE em tubos contendo caldo VM-VP. Após incubação a 35°C por 5 dias transferiram-se 5 ml e 1 ml para dois tubos estéreis. No primeiro foi colocado duas a três gotas de vermelho de metila solução alcoólica. No outro tubo foi adicionado 0,6 ml de solução alcoólica de alfa-naftol 5% e 0,2 ml de solução aquosa de hidróxido de potássio 40%. Foi deixado em repouso por uma a duas horas para se verificar o aparecimento ou não de cor vermelha.

Semearam-se ainda os cultivos em tubos contendo caldo nitrato. Após incubação a 35°C, acrescentaram-se 2 a 3 gotas de ácido sulfanílico e 2 a 3 gotas de alfa-naftilamina para se verificar o aparecimento ou não de cor rosa indicando redução de nitrato a nitrito.

Todas as cepas apresentaram-se na forma de colônias verde azuladas quando semeadas em meio ATN e examinadas por luz transmitida obliquamente.

No exame de morfologia após coloração pelo método de Gram, apareceram como bastonetes curtos Gram positivos. A motilidade típica em cambalhota foi visualizada no teste de gota pendente. Foram todas catalase positiva e fermentaram a ramnose, mas não o manitol e a xilose. Produziram ácidos a partir da glicose, sacarose e a lactose presentes no TSI (tríplice açúcar feno), sem produção de H₂S.

As provas de VM/VP foram positivas e não houve redução de nitrato a nitrito em nenhuma das cepas. Todas produziram β-hemólise em ágar sangue de cavalo e cobaia, exceto *L. innocua* que se diferenciava das demais cepas por não apresentar hemolisina.

A manutenção das cepas foi feita em ágar soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura a 4°C. Cepas crescidas em

caldo soja tripticase com 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE) e 10% de glicerol, foram estocadas em ampolas em alíquotas de 1 ml e congeladas a -70°C.

4.2.2. INVASÃO E MULTIPLICAÇÃO DE *L. monocytogenes* EM CÉLULAS VERO

O teste de invasão e multiplicação de bactérias em células cultivadas "in vitro", é descrito nos trabalhos de PEDERSEN et alii, 1979; KAPPERUD, 1980; SCALETSKY et alii, 1984; SMALL et alii, 1987; GAILLARD et alii, 1987.

Embora existam algumas variações nos tempos de infecção e multiplicação, todos os autores seguem um protocolo básico que consiste em adicionar uma suspensão bacteriana a uma suspensão de células crescidas sobre lamínulas em tubos Leighton, que corresponde ao período de infecção. Após esta etapa, segue-se um período de multiplicação intracelular das células bacterianas que podem ser visualizadas através da fixação, coloração e montagem das lamínulas em lâminas.

4.2.2.1. PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

As ampolas contendo cultivo de *L. monocytogenes* foram descongeladas e as bactérias foram cultivadas em caldo soja tripticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSB-YE). À temperatura de 37°C foram incubadas por 24 horas, a 22°C por 5 dias e a 4°C foram incubadas por 10 dias.

Após o crescimento, as bactérias foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos. Os precipitados foram lavados 3 vezes com tampão de salina fosfato (PBS) pH 7,1 e foram suspensos em água peptonada a 0,1% de modo a conter $6,0 \times 10^7$ unidades formadoras de colônias (UFC) por ml pela escala Mac Farland.

A concentração de bactérias foi acompanhada pela contagem em placas, utilizando-se o ágar triptose adicionado de ácido nalidíxico (ATN) e incubação a 30°C por 24 horas.

4.2.2.2. CULTIVO DE CÉLULAS VERO EM LAMÍNULAS E EM TUBOS DE ENSAIO

As células Vero eram mantidas em meio mínimo essencial (MEM) adicionado de 10% de soro fetal bovino e 10% de glicerina. Estavam ampoladas e congeladas em nitrogênio líquido.

No momento de uso as células foram descongeladas em banho-maria (37-40°C) e no fluxo laminar após desinfecção da ampola com álcool 70% as células foram retiradas com auxílio de pipeta volumétrica e foram transferidas para garrafas de ROUX. Foi adicionado o meio mínimo essencial de crescimento, suplementado com 10% de soro fetal bovino (MEM-SFB10%), estreptomicina e penicilina.

As garrafas foram incubadas a 36,5°C aguardando a confluência das células, quando então começaram a ser repicadas em outras garrafas de cultura.

As células Vero crescidas em garrafas de ROUX foram tripsinizadas e após contagem feita em câmara de Neubauer foram diluídas e distribuídas em tubos de ensaio e em tubos Leighton com lamínulas encaixadas nas depressões achatadas.

Os tubos de ensaio e os tubos Leighton receberam 1 ml da suspensão contendo $3,0 \times 10^5$ células por ml, sendo que as monocamadas de células Vero se desenvolveram sobre as lamínulas e nas paredes internas dos tubos de ensaio.

Os cultivos celulares dos tubos foram mantidos a 37°C por 24 horas com MEM-SFB10% e antibióticos (estreptomicina e penicilina).

No momento do uso foi desprezado o meio de cultura dos tubos e os cultivos celulares foram lavados 3 vezes com tampão de salina fosfato acrescentado de 8% de soro fetal bovino (PBS-SFB 8%), estando dessa forma preparados para receberem as suspensões de bactérias.

4.2.2.3. INFECÇÃO DOS CULTIVOS CELULARES

As lamínulas dos tubos Leighton e os tubos de ensaio contendo no momento do teste $6,0 \times 10^5$ células por ml, receberam 0,9 ml de MEM-SFB10% sem antibióticos e 0,1 ml das suspensões bacterianas com $6,0 \times 10^7$ UFC/ml.

Na oitava hora de infecção, tempo em que ocorreu a internalização de *L.monocytogenes*, os cultivos das lamínulas e dos tubos de ensaio foram lavados 6 vezes com PBS-SFB 8% para remoção das bactérias extracelulares. Para garantir a eliminação total dessas bactérias extracelulares, os cultivos celulares foram incubados durante 40 minutos com MEM-SFB 10% adicionado de sulfato de gentamicina na concentração final de $50 \mu\text{g/ml}$ (KUHN & GOEBEL, 1989).

Em seguida desprezou-se o meio de cultura adicionado de gentamicina e as células foram lavadas 2 vezes com PBS-SFB 8% (KUHN & GOEBEL, 1989).

Os tubos foram reincubados a 37°C com MEM-SFB 10%, sendo retirados da estufa nos períodos de 8, 12, 15 e 18 horas para a realização da contagem das bactérias e da microscopia dos cultivos celulares.

4.2.2.4. LEITURA MICROSCÓPICA DOS CULTIVOS CELULARES

As células cultivadas em lamínulas foram lavadas 3 vezes com PSB-SFB 8% e em seguida adicionou-se 1 ml de metanol p.a. durante 30 minutos para fixá-las.

Após esse tempo desprezou-se o metanol e corou-se com eosina azul de metileno a 0,2% segundo May-Grunwald, diluído 1:2 em água destilada.

Desprezou-se o corante de May-Grunwald e corou-se durante 15 minutos com Giemsa diluído 1:3 em água destilada.

As lamínulas coradas foram então lavadas em água corrente e removidas dos tubos Leighton. Após secagem a 30°C foram montadas em lâminas de vidro, 76x25 mm, com uso de bálsamo do Canadá.

A leitura das lamínulas foi feita ao microscópio com o aumento de 400 e 1.000 vezes e considerou-se o teste positivo de invasibilidade, a presença de bactérias dentro do citoplasma e no mesmo nível do núcleo quando observados com o auxílio do micrometro.

4.2.2.5. ENUMERAÇÃO BACTERIANA DOS CULTIVOS CELULARES

Nos períodos de 8, 12, 15 e 18 horas os cultivos celulares dos tubos de ensaio foram lavados 3 vezes com PSB-SFB 8% e em seguida foram lisados pela adição de 1 ml de Triton X-100 a 1% durante 3 minutos (KUHN & GOEBEL, 1989).

Foram feitas diluições decimais (em duplicata) de 10^{-1} a 10^{-3} em água peptonada 0,1% e 1 ml de cada diluição foi transferido para placas de Petri. Adicionou-se 15 ml de água triptose com ácido nalidíxico a 2%, previamente fundido e mantido a 45°C.

Após incubação das placas a 30°C por 24 horas, procedeu-se a contagem das colônias com auxílio de conta-colônias.

A contagem foi feita segundo o método oficial do Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (1981), e os valores foram expressos em UFC/ml.

Quando nas diversas diluições o número de colônias se encontrava entre os limites 30 e 300 foi multiplicado o resultado encontrado em cada placa pelas respectivas diluições e calculado a média aritmética.

Quando as placas de todas as diluições apresentavam mais de 300 colônias foram contadas as colônias de quatro quadrados representativos e foi calculado a média e multiplicado pelo fator 65.

No caso de todas as diluições terem apresentado menos de 30 colônias, o resultado foi expresso pelo número de colônias da placa de menor diluição e quando uma ou mais placas apresentavam acima de 300 colônias, foi registrado o número mais próximo de 300.

4.2.3. INVASÃO E MULTIPLICAÇÃO DE *L. monocytogenes* EM MACRÓFAGOS

4.2.3.1. PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

As suspensões bacterianas foram preparadas conforme técnica descrita em células Vero, porém foram padronizadas em $1,2 \times 10^8$ UFC/ml.

4.2.3.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS EM LAMÍNULAS E EM TUBOS DE ENSAIO

Na coleta e processamento das células macrófagos utilizamos a técnica conforme descreve (WALKER et alii, 1991).

Inicialmente os camundongos foram anestesiados com éter e sacrificados por deslocamento cervical. Tiveram a superfície abdominal desinfetada com álcool 70% e com o uso de pinça e bisturi estéreis fez-se o descolamento do peritônio.

Foram inoculados com o uso de seringa descartável, 5 ml de MEM-SFB 10% na cavidade abdominal e após massagem peritoneal suave, coletou-se o lavado peritoneal em Erlenmeyer que foi mantido em banho de gelo.

A suspensão das células foi centrifugada a 4°C por 3 minutos a 1.000 rpm e o precipitado foi ressuspensão em 5 ml de MEM-SFB 10%.

Após homogeneização retirou-se 0,5 ml da suspensão celular que foi colocada em tubo de ensaio com 0,5 ml de azul tripan a 0,4%, fazendo-se em seguida a contagem em câmara de Neubauer.

O critério utilizado na contagem de macrófagos foi o mesmo tradicionalmente utilizado para a contagem de glóbulos brancos e outras células descritas na literatura (RIZZO et alii, 1983).

Contaram-se as células isoladas e não coradas em azul nos quatro quadriláteros grandes e externos de um lado da câmara.

O número de células existentes em cada ml da suspensão de células inicial foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{n}^\circ. \text{ de células por ml} = \frac{\text{n}^\circ. \text{ de células vivas}}{\text{n}^\circ. \text{ de macróf. contados}} \times \text{fator de diluição} \times \text{fator de conversão da câmara}$$

-fator de conversão da câmara = 10.000

Em seguida foi calculado o volume de células e de meio de cultura necessários para o preparo da suspensão celular a ser inoculado nos tubos Leighton e nos tubos de ensaio, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Vol. da suspensão do Erlenmeyer} = \frac{\text{Vol. desejado} \times \text{concentração de células}}{\text{células/ml}}$$

Volume desejado = N^o. de tubos x 1,2 ml.

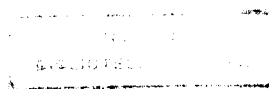
Concentração de células desejadas = 1,2 x 10⁶ cél./ml.

Volume do meio de cultura = Vol. desejado - Vol. da suspensão do Erlenmeyer.

Após ter-se completado a suspensão celular com o meio de cultura, homogeneizou-se bem e distribuiu-se 1 ml dessa suspensão nos tubos de ensaio e nas lamínulas dos tubos Leighton.

Foi feita pré-incubação por uma hora a 37°C e após esse período as células foram lavadas 3 vezes com PBS-SFB 8% para a remoção das células não aderentes.

Colocou-se novamente MEM-SFB 10% com estreptomicina e penicilina e incubou-se a 37°C até o momento de uso.



4.2.3.3. INFECÇÃO DOS CULTIVOS CELULARES

O procedimento da infecção de *L. monocytogenes* em macrófagos foi o mesmo utilizado na infecção de células Vero; porém, neste experimento os cultivos celulares contendo $1,2 \times 10^6$ células por ml foram infectados com 0,1 ml da suspensão bacteriana contendo $1,2 \times 10^8$ UFC/ml.

Na primeira hora de infecção já havia internalização da bactéria nos macrófagos e neste momento as células foram tratadas com sulfato de gentamicina na concentração de 50 μ g para eliminação das bactérias extracelulares.

A multiplicação intracelular de *L. monocytogenes* foi investigada com 2, 4, 7 e 13 horas após a infecção, quando então fez-se a contagem das bactérias em placas e a leitura das lamínulas.

Todos os ensaios foram realizados em fluxo laminar e com bico de Bunsen ligado. Antes do uso era feita a limpeza e desinfecção de toda a superfície interna usando-se gase embebida em álcool 70%. Em seguida ligava-se a luz ultravioleta e depois de 15 minutos ligava-se o ar do fluxo. A luz ultravioleta era desligada após 5 minutos.

Feita a limpeza e desinfecção, avaliava-se a eficiência do fluxo laminar, colocando-se placas de ágar sangue no fundo e frente do lado esquerdo, fundo e frente do lado direito e região central. As placas permaneciam abertas durante dez minutos e em seguida eram incubadas a 37°C por 48 horas.

4.2.3.4. LEITURA MICROSCÓPICA DOS CULTIVOS CELULARES

As células cultivadas em lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS-SFB 8% e em seguida adicionou-se 1 ml de metanol p.a. durante 30 minutos para fixá-las.

Após ter-se desprezado o metanol corou-se com eosina azul de metileno a 0,2% segundo May-Grunwald e com Giemsa conforme técnica já descrita em células Vero.

As lamínulas coradas foram lavadas, removidas dos tubos Leighton e após secagem foram montadas em lâminas para se verificar a internalização nos macrófagos.

4.2.3.5. ENUMERAÇÃO BACTERIANA DOS CULTIVOS CELULARES

Nos períodos de 1, 2, 4, 7 e 13 horas os cultivos celulares dos tubos de ensaio foram lavados 3 vezes com PBS-SFB 8% e em seguida foram lisados pela adição de 1 ml de Triton X-100 diluído a 1% durante 3 minutos.

Após diluições decimais (em duplicata) de 10^{-1} a 10^{-3} em água peptonada 0,1%, 1 ml de cada diluição foi transferido para placas de Petri. Adicionou-se 15 ml de ágar triptose com ácido nalidíxico a 2%, previamente fundido e mantido a 45°C.

Após incubação das placas a 30°C por 24 horas, procedeu-se a contagem das colônias conforme técnica descrita em células Vero.

4.2.4. DOSE LETAL (DL₅₀) PARA EMBRIÕES DE GALINHA DE CEPAS DE *L. monocytogenes* CULTIVADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS

4.2.4.1. PREPARO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS

O procedimento no preparo das suspensões das bactérias crescidas a 37, 22 e a 4°C foi o mesmo adotado no preparo das

suspensões utilizadas no teste de invasão da bactéria em cultivos celulares, variando somente a concentração de bactérias que foi de 10×10^{10} UFC/ml.

Foram feitas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-12} em água peptonada 0,1% a serem inoculadas em ovos embrionados de galinha.

4.2.4.2. INFECÇÃO DOS OVOS EMBRIONADOS

Feita a determinação da viabilidade embrionária por ovoscopia, marcamos na casca com o uso de lápis, o ponto na câmara de ar, onde deveria ser feito o orifício de inoculação de *L. monocytogenes*, evitando sempre a proximidade com grandes vasos.

Em fluxo laminar os ovos foram desinfetados com álcool iodado, e após a perfuração da casca com agulha estéril, foram inoculados com 0,1 ml das diluições (10^{-1} a 10^{-12}) das suspensões bacterianas. Foram inoculados 6 ovos por diluição e ovos embrionados não inoculados foram mantidos como controle negativo.

Os orifícios de inoculação foram vedados com parafina líquida e os ovos posteriormente foram incubados a 37°C em chocadeiras de madeira com capacidade para 120 ovos. Foram feitas 3 viragens manuais dos ovos diariamente. A temperatura das incubadoras foi regulada com termômetro de mercúrio, e a umidade interna foi mantida com a colocação de bandejas com água.

4.2.4.3. LEITURA DOS RESULTADOS

A leitura da viabilidade embrionária foi feita diariamente pelo período de 7 dias consecutivos. A DL_{50} foi calculada segundo o método de REED & MUENCH (1938), sendo que a mortalidade embrionária das primeiras 24 horas não foi utilizada para efeito de cálculo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. INVASÃO DE *Listeria monocytogenes* EM CÉLULAS VERO

Constatamos neste ensaio que houve uma demora muito grande para que ocorresse a invasão de *L. monocytogenes* em células Vero. Como só após oito horas de inoculação é que observássemos internalização significativa de todas as cepas, fixamos esse período como sendo o primeiro a ser representado, conforme Tabela 1.

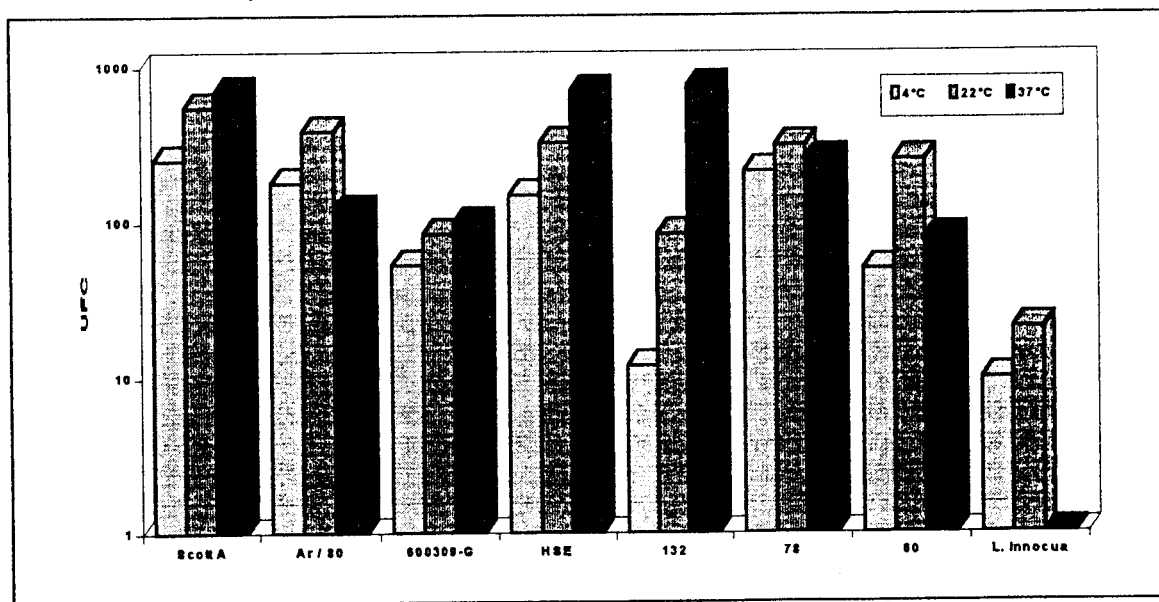
Embora a invasão de *L. monocytogenes* tenha sido estudada em linhagens de células como fibroblastos e células epiteliais (HAVELL, 1986; GAILLARD et alii, 1986; GAILLARD et alii, 1987; PORTNOY et alii, 1988) não encontramos na literatura especializada ensaio com células Vero que pudéssemos confrontar com nossos resultados.

TABELA 1 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após oito horas de contato com cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4	22	37
Scott A	251	550	700
Ar / 80	180	385	121
600309-G	53	84	100
HSE	150	325	700
132	12	85	750
78	210	310	252
60	50	250	80
<i>L. innocua</i>	10	21	0

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

GRÁFICO 1- Número de células bacterianas no interior de células Vero após oito horas de contato com cepas de *L. monocytogenes* em diferentes temperaturas.



Observando a Tabela 1 e o Gráfico 1 verificamos que as cepas invadiram as células de forma bastante irregular.

A 4°C, por exemplo, tivemos cepas altamente invasivas como a Scott A e a 78 e cepas com baixa invasibilidade como a 132 seguida da 60 e 600309-G.

A 22°C temos como cepas mais invasivas a cepa Scott A, AR/80, HSE, 78 e 60. As únicas que tiveram pouca invasibilidade à essa temperatura foram as cepas 600309-G e a 132, aliás tiveram praticamente o mesmo grau de invasão.

A 37°C encontramos cepas 132 como sendo a mais invasiva. As cepas Scott A e a HSE tiveram a mesma invasibilidade, que foi bastante próxima da 132.

A cepa 60 teve a menor invasibilidade; já as cepas Ar/80 e 600309-G embora fossem ligeiramente mais invasivas do que a 60, também podem ser consideradas de baixa invasibilidade quando comparadas com as demais cepas.

5.2. MULTIPLICAÇÃO DE *L.monocytogenes* EM CÉLULAS VERO

Apresentamos a seguir a Tabela 2 que apresenta o número de bactérias encontrado no interior de células Vero após doze horas de infecção, período que corresponde ao crescimento intracelular.

TABELA 2 - Número de células bacterianas no interior de células Vero após doze horas de inoculação com cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4	22	37
Scott A	700	850	900
Ar / 80	600	540	150
600309-G	100	100	140
HSE	300	800	900
132	10	120	820
78	600	400	310
60	100	300	100
L. innocua	10	20	0

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

Esta Tabela só nos permite afirmar que o número de UFC variou de 10 a um número máximo de 500 UFC, pois não reflete por si só as diferenças de cada cepa no processo de multiplicação.

Calculamos, portanto, o índice de multiplicação, para saber quantas vezes cada cepa se multiplicou.

Obtivemos o índice de multiplicação, dividindo o número final pelo número inicial de UFC, e para visualizarmos melhor as diferenças entre os grupos clínicos e alimentar calculamos a média dos índices desses dois grupos. Esses valores estão expressos na Tabela 3.

TABELA 3 - Índice de multiplicação em células Vero para as diferentes cepas de *Listeria* cultivadas a 4, 22 e 37°C.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4°C	22°C	37°C
Scott A	2,78	1,54	1,28
Ar/80	3,33 $\bar{x} = 2,49$	1,40 $\bar{x} = 1,64$	1,23 $\bar{x} = 1,29$
600309-G	1,88	1,19	1,40
HSE	2,00	2,46	1,28
132	--	1,41	1,09
78	2,85 $\bar{x} = 1,61$	1,29 $\bar{x} = 1,30$	1,23 $\bar{x} = 1,19$
60	2,00	1,20	1,25
L.innocua	--	--	0

De modo geral, observamos que o maior índice de multiplicação ocorreu a 4°C com as cepas clínicas. As demais temperaturas não foram significativas na diferenciação de cepas clínicas e alimentares, embora algumas cepas mereçam destaque.

É o caso da cepa Ar/80 que a 4°C teve o maior índice de multiplicação, superando as demais cepas, inclusive às outras temperaturas.

As cepas HSE e 60 tiveram o mesmo índice de multiplicação e partiram de invasibilidade completamente diferentes; já a cepa 132 não se reproduziu a 4°C se diferenciando das demais cepas.

Observando a Tabela 1, que corresponde à invasão, notamos que a 22°C a cepa Scott A que mostrou maior invasibilidade não teve o maior índice de multiplicação a essa temperatura, ficando o maior índice com a HSE.

Se a 37°C encontramos índice iguais de multiplicação para as cepas Scott A e HSE que tiveram a mesma invasibilidade, o mesmo já não ocorreu com as cepas 78 e Ar/80 que também apresentaram os mesmos índices tendo ambas partido de invasibilidades distintas.

Neste ensaio verificamos, portanto, que os fatores que controlam a invasão, provavelmente não sejam os mesmos que controlam o processo de multiplicação.

O estudo da multiplicação após doze horas tornou-se difícil, pois após esse momento as células começaram a se desintegrar. O período de invasão (oito horas), por ter sido muito longo, acarretou a multiplicação de bactérias extracelulares, expondo por muito tempo as células Vero à ação tóxica de *L. monocytogenes*.

Em síntese, embora as células Vero não tivessem propiciado condições melhores para acompanhamento e comparação das cepas no processo multiplicação, pudemos constatar, entretanto, que cepas de *L. monocytogenes* conseguem invadí-las e se multiplicar no seu interior.

5.3. INVASÃO DE *L. monocytogenes* EM MACRÓFAGOS

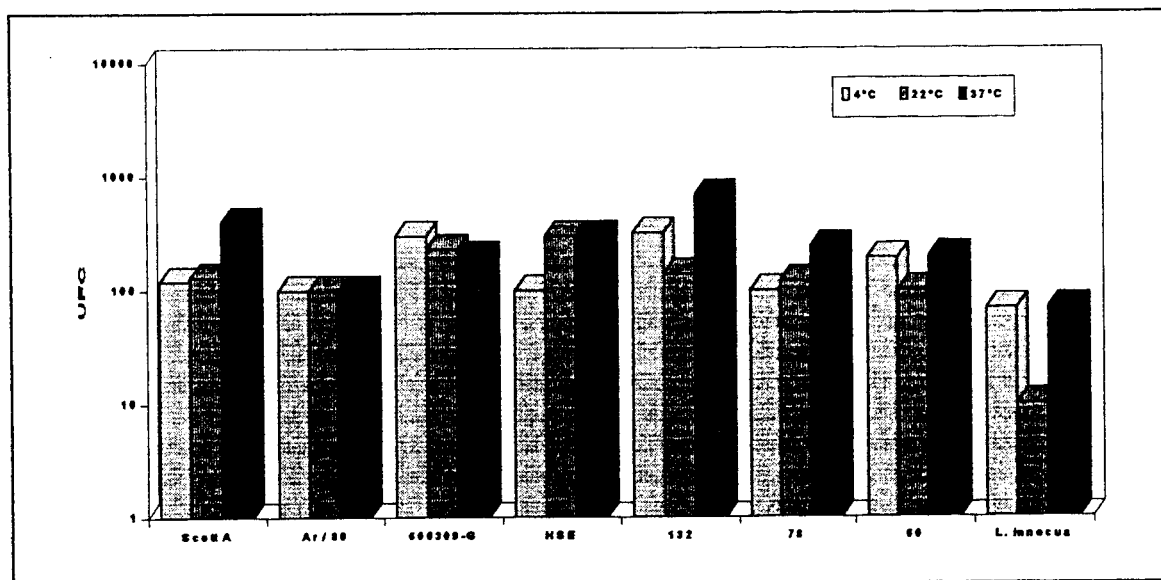
A invasibilidade em macrófagos por diferentes cepas de *Listeria* foi ensaiada em vários tempos de contato. Os resultados obtidos na primeira hora de contato entre bactérias e células mostraram que a temperatura de cultivo das cepas de *L. monocytogenes* influenciou na invasibilidade das mesmas em macrófagos.

TABELA 4 - Número de células bacterianas no interior de macrófagos após uma hora de contato com cepas de *Listeria* cultivadas em diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4	22	37
Scott A	120	130	400
Ar / 80	100	100	100
600309-G	300	230	200
HSE	100	300	300
132	320	140	690
78	100	120	240
60	190	100	200
L. innocua	69	10	70

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

GRÁFICO 2 - Número de células bacterianas no interior de macrófagos após uma hora de contato com cepas de *Listeria* cultivadas em diferentes temperaturas.



De um modo geral, as cepas mantidas e repicadas a 37°C mostraram tendência de maior invasibilidade do que quando cultivadas a 4 e 22°C (Tabela 4 e Gráfico 2).

Esses dados sugerem que a invasibilidade de macrófagos por cepas de *Listeria* possa ser modulada pela temperatura de cultivo das mesmas e pelo tempo de contato. Na verdade, há exemplos na literatura mostrando que genes de virulência de algumas espécies de *Shigella* são reguladas pela temperatura de cultivo. Sua invasibilidade requer cultivo anterior na temperatura de 37°C (MAURELLI et alii, 1984).

Foi demonstrado, também, que *E. coli* EIEC necessita ser cultivada a 37°C para expressar o fenótipo de invasão em células epiteliais Hep-2 (SMALL et alii, 1987).

Por outro lado, analisando a mesma Tabela e Gráfico constatamos que houve diferença entre cepas quanto ao grau de invasibilidade, quando comparadas à mesma temperatura.

Desta maneira, a 4°C tivemos cepas que foram mais invasivas (132 e 600309-G) e cepas que foram menos invasivas (Ar/80, HSE e 78).

A 22°C também encontramos diferenças na invasibilidade. A HSE e a 600309-G invadiram em maior grau do que as outras cepas como a Ar/80 e a 60, que aliás, foram as menos invasivas. Também a 37°C tivemos cepas altamente invasivas como a 132 e cepas com grau reduzido de invasibilidade como Ar/80.

Del CORRAL et alii (1991), estudando *L. monocytogenes* de origem clínica e de alimentos em células epiteliais Hep-2 observaram que a invasão dessa bactéria variou entre as cepas de 2,5 a 4,8 (log UFC).

MEYER et alii (1992), também constataram essa variação de invasibilidade em cepas isoladas de casos clínicos, alimentos e meio-ambiente.

Utilizaram duas linhagens de células de cólon humano RPMI-4788 e HT-29 e observaram que a variação de invasão de *L. monocytogenes* na célula RPMI-4788 foi de 127 ± 21 a 4 ± 0 UFC. Na outra linhagem de células a invasão variou de 488 ± 21 a 5 ± 0 UFC.

Podemos fazer algumas comparações com o nosso ensaio a 37°C, já que os outros autores não pesquisaram a 4 e 22°C.

Nessa temperatura, a invasibilidade das cepas, no nosso trabalho, variou de 100 a 690 UFC. Não tivemos cepa com invasão tão reduzida como 5 ± 0 ou 4 ± 0 como no ensaio acima citado. Entretanto, o número máximo de UFC por nós encontrado a 37°C (690 UFC) se aproxima, de certa maneira, do número máximo por eles encontrado, que foi de 488 ± 21 UFC.

Devemos, contudo, levar em consideração que a linhagem de células bem como as cepas utilizadas em nosso ensaio, foram distintas das empregadas pelos outros autores.

Na realidade, ainda não se têm conhecimento de todos os fatores que influenciam o processo de invasibilidade de *L. monocytogenes* em células.

Estudos mais recentes, entretanto, têm mostrado que o processo de invasão é controlado pelo gene *inlA* que codifica uma proteína de 80 KDa, a internalina (PORTNOY et alii, 1992).

Sabemos também que cepas rugosas de *L. monocytogenes* mostram reduzida quantidade de proteína p60 e baixa invasibilidade. Interessantemente, cepas rugosas mudam de forma espontânea para cepas lisas, recuperam a quantidade de proteína p60, aumentando a capacidade de invasão (KUHN & GOEBEL, 1989).

Apesar de sabermos que essas proteínas atuam no processo de invasão, não podemos responsabilizá-las pelas variações de invasibilidade encontradas entre as cepas. Isto se deve ao fato de não termos total conhecimento de como elas atuam sob o efeito de fatores ambientais, como a temperatura.

Prosseguindo na análise da Tabela 4, observamos ainda que a diferença de invasão entre as cepas ocorrem indistintamente, não sendo possível associarmos a invasão com a origem das cepas, o que está de acordo com os estudos de (Del CORRAL et alii, 1991 e MEYER et alii, 1992) que não encontraram correlação entre a origem das cepas e invasão em células.

5.4. MULTIPLICAÇÃO DE *L.monocytogenes* EM MACRÓFAGOS

Apresentamos a seguir a Tabela 5 que ilustra o número de bactérias encontrado no interior de macrófagos decorrido o período de 13 horas, período esse que reflete a multiplicação intracelular de *L. monocytogenes*.

TABELA 5 - Número de células bacterianas no interior de macrófagos após treze horas de inoculação com cepas de *Listeria* cultivadas em diferentes temperaturas.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4	22	37
Scott A	8100	5000	9000
Ar / 80	7100	1800	6200
600309-G	9200	850	6000
HSE	1800	1500	2400
132	3400	2400	7200
78	1700	3500	1300
60	2000	800	980
<i>L. innocua</i>	0	0	31

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

A Tabela 5 só nos permite dizer que a contagem final de UFC variou bastante, oscilando na faixa de 800 UFC (cepa 60) a 9200 UFC (cepa 600309-G).

Estes números por si só não revelam o comportamento dinâmico das cepas; apenas, representam simples expressões numéricas das UFC na 13^a. hora.

Se quisermos captar o dinamismo de cada cepa, temos que recorrer a indicadores que relacionem a quantidade final e inicial de UFC.

Assim, dividindo a quantidade final (13 horas) pela inicial (1 hora) teremos os índices de multiplicação de cada cepa, representados na Tabela 6.

TABELA 6 - Índice de multiplicação em macrófago para diferentes cepas de Listeria cultivadas a 4, 22 e 37°C.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4°C	22°C	37°C
Scott A	67,5	38,4	22,5
Ar/80	71,0 $\bar{x} = 46,7$	18,0 $\bar{x} = 16,27$	62,0 $\bar{x} = 30,6$
600309-G	30,6	3,7	30,0
HSE	18,0	5,0	8,0
132	10,6	17,14	10,4
78	17,0 $\bar{x} = 12,7$	29,16 $\bar{x} = 18,1$	5,4 $\bar{x} = 6,9$
60	10,5	8,0	4,9
L.innocua	0	0	0

Utilizamos para análise e comparação dos resultados, média aritmética, pois esta permite fácil visualização do grupo como um todo.

Analisando-se, portanto, os dados através das médias dos índices, podemos observar que as taxas de multiplicação das cepas clínicas são 3,65 e 4,43 vezes superiores as taxas médias das cepas alimentares respectivamente a 4 e 37°C.

Dito de outra forma, a taxa de multiplicação verificada para as cepas obtidas de casos clínicos é por volta de quatro vezes maior do que a taxa de multiplicação apontada para as cepas obtidas de alimentos, válido este resultado para as temperaturas de 4 e 37°C.

De certa forma, alguns trabalhos de tipificação molecular têm demonstrado existir características encontradas em cepas clínicas a nível de isoenzimas PIFFARETTI et alii (1989) e "ribovar" JACCUET et alii (1992) que não são encontradas em cepas alimentares.

Embora não se tenha conhecimento do efeito desse componentes no processo de multiplicação intracelular de *L. monocytogenes*, nosso experimento e os trabalhos desses autores convergem para o fato de existirem diferenças entre cepas clínicas e cepas isoladas de alimentos.

Observando ainda os dois grupos de cepas na Tabela 6, podemos destacar algumas particularidades.

A cepa 78 foi a menos invasiva no grupo das alimentares a 4°C, e no entanto teve a maior taxa de multiplicação entre as cepas do mesmo grupo; já a 132 foi a mais invasiva de todas as cepas e teve a menor taxa de multiplicação.

A Ar/80 teve baixa invasibilidade e conseguiu ter o maior índice de multiplicação de todas as cepas. A HSE esteve entre as menos invasivas e foi a que teve a menor taxa de multiplicação das cepas clínicas.

Constatamos ainda a 4°C que cepas como a 60 e a 132 embora partissem de invasibilidades bem diferentes conseguiram ter o mesmo índice de multiplicação.

Tivemos, ainda, cepas com taxas de invasão idênticas como a Ar/80 e a HSE, que no entanto, tiveram comportamentos distintos no processo de crescimento intracelular.

A 22°C destacam-se as cepas Scott A e a 78 que embora tivessem baixa invasibilidade tiveram grande desenvolvimento intracelular.

A HSE embora tenha sido a maior invasiva de todas as cepas ensaiadas, foi superada na fase de multiplicação por cepas menos invasivas como a Scott A, Ar/80, 132 e 78.

O índice de multiplicação mais baixo a 22°C foi da cepa 600309-G; entretanto a invasibilidade foi alta quando comparada com outras cepas do mesmo grupo. O mesmo ocorreu com a HSE que foi

mais invasiva e no entanto apresentou uma das menores taxas de multiplicação.

Do grupo das cepas alimentares destaca-se a cepa 78 que teve, assim como a 4^oC, o maior índice de multiplicação. A cepa 60, embora a sua invasibilidade não fosse tão diferente da cepa 78, ficou com o menor índice de multiplicação, apenas 8,0.

Observando os índices a 37^oC, notamos que a menos invasiva das cepas incluindo as clínicas e as alimentares foi a Ar/80; no entanto foi a que teve o maior índice de multiplicação.

A HSE foi uma das cepas mais invasivas e apresentou o menor índice de crescimento celular.

A cepa 60 do grupo das alimentares teve a menor taxa de multiplicação e a taxa mais alta ficou com a cepa 132 que também foi a mais invasiva inclusive superando as demais cepas clínicas e alimentares.

O fato de constarmos cepas pouco invasivas com alta taxa de multiplicação e cepas altamente invasivas que se multiplicaram com pouca intensidade nos leva a supor que os fatores que controlam a invasão são independentes dos fatos que controlam a multiplicação.

Em nossa revisão bibliográfica não encontramos, entretanto, nenhum estudo que associasse taxa de invasão à taxa de multiplicação seja em macrófagos ou quaisquer outras células.

Aliás, os macrófagos têm sido bastante utilizados "in vitro" para estudos qualitativos de virulência (Van DISSEL et alii, 1987; PORTNOY et alii, 1989; TILNEY & PORTNOY, 1989; CAMILLI et alii, 1991; HAUF et alii, 1994; KUHN & GOEBEL, 1994).

Todavia, não encontramos estudos quantitativos semelhantes aos por nós efetuados, mostrando o efeito da temperatura na invasão e multiplicação de *L. monocytogenes* em macrófagos, para que pudéssemos comparar os resultados por nós obtidos.

Atualmente, os trabalhos de *L. monocytogenes* têm se orientado mais para os estudos genéticos, inclusive com o uso de *Bacillus subtilis* (BIELECKI et alii, 1990; FREITAG et alii, 1992) e

Listeria innocua como hospedeiros para a expressão de gens de *L. monocytogenes*.

Outra modalidade de análise dos grupos que podemos efetuar é a comparação dos grupos das cepas às três temperaturas.

De acordo com os resultados que obtivemos, verificamos que as cepas clínicas embora tivessem se multiplicado em níveis altos a 37°C, multiplicaram-se melhor a 4°C. As alimentares se multiplicaram bem às menores temperaturas ensaiadas (4 e 22°C).

Embora não conheçamos todos os fatores envolvidos no processo de multiplicação, sabemos que a hemolisina é o fator mais importante, sendo responsável pela ruptura do vacúolo fagolisossomo e conseqüente multiplicação de *L. monocytogenes* no citoplasma da célula (GAILLARD et alii, 1986; KATHARIOU et alii, 1987; PORTNOY et alii, 1988).

Segundo (GIRARD et alii, 1963; KHAN, 1973), a produção de hemolisina alcança níveis mais altos à temperaturas reduzidas, embora esse efeito pareça ser dependente da cepa.

Se for verdade, podemos especular que os grupos alimentares a 4 e 22°C e o grupo clínico a 4°C teriam produzido maior quantidade de hemolisina, ou algum outro fenômeno estaria ocorrendo, fazendo com que as cepas se multiplicassem em maiores níveis.

Finalmente, analisaremos a cinética das cepas de *L. monocytogenes* no decorrer do ensaio.

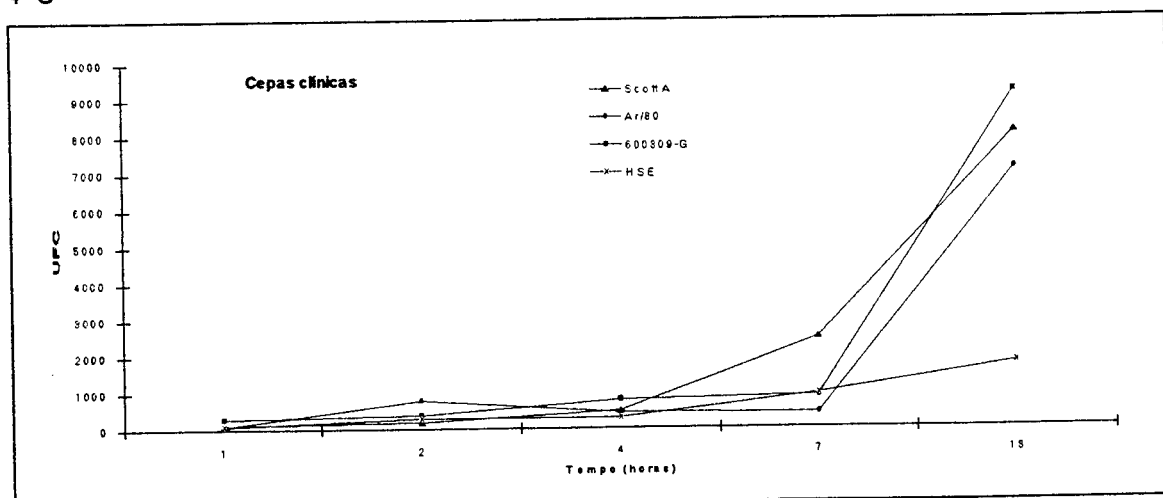
Os resultados das contagens das UFC nos intervalos de tempo de 1 a 13 horas estão representados nos Quadros 2, 3 e 4 e permitem fácil comparação entre cepas alimentares e clínicas.

QUADRO 3 - Número de células bacterianas, cultivadas a 4°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.

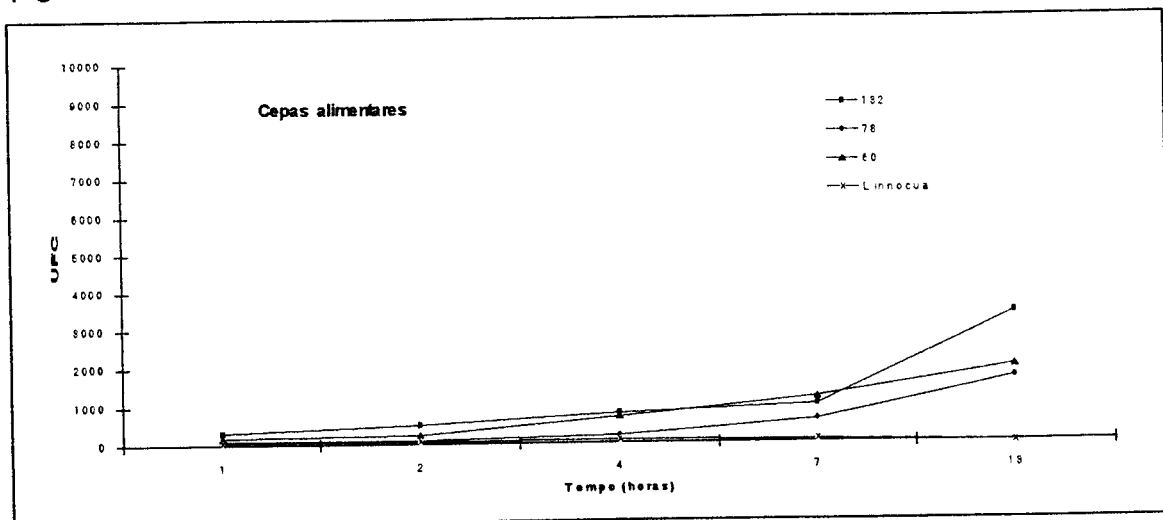
Cepa	Tempo (horas)				
	1	2	4	7	13
Scott A	120	200	500	2500	8100
Ar/80	100	800	450	420	7100
600309-G	300	400	800	900	9200
HSE	100	300	300	950	1800
132	320	510	800	1000	3400
78	100	100	200	600	1700
60	190	240	700	1200	2000
L.innocua	69	72	86	70	0

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

4°C



4°C

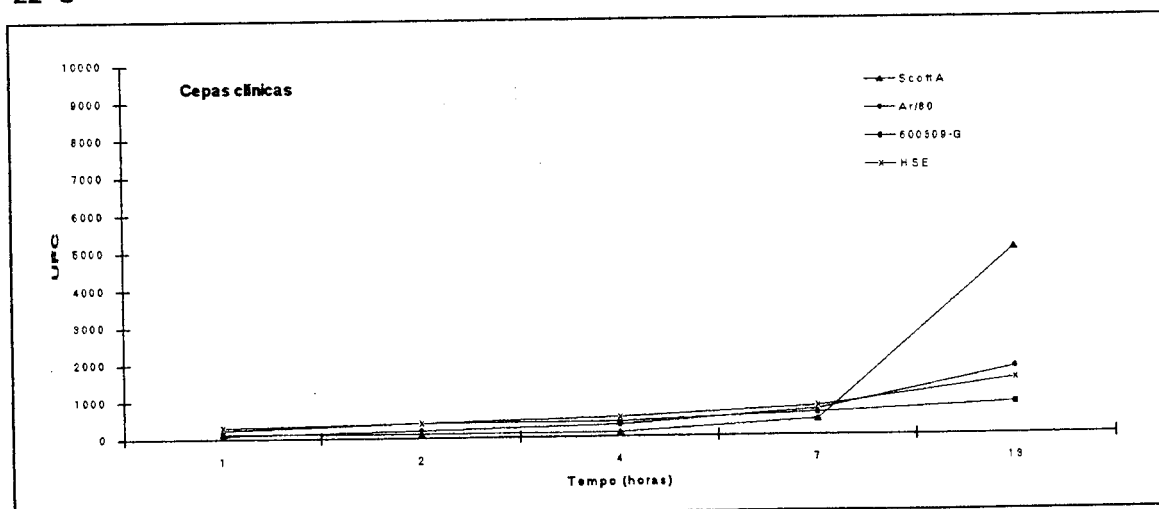


QUADRO 4 - Número de células bacterianas, cultivadas a 22°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.

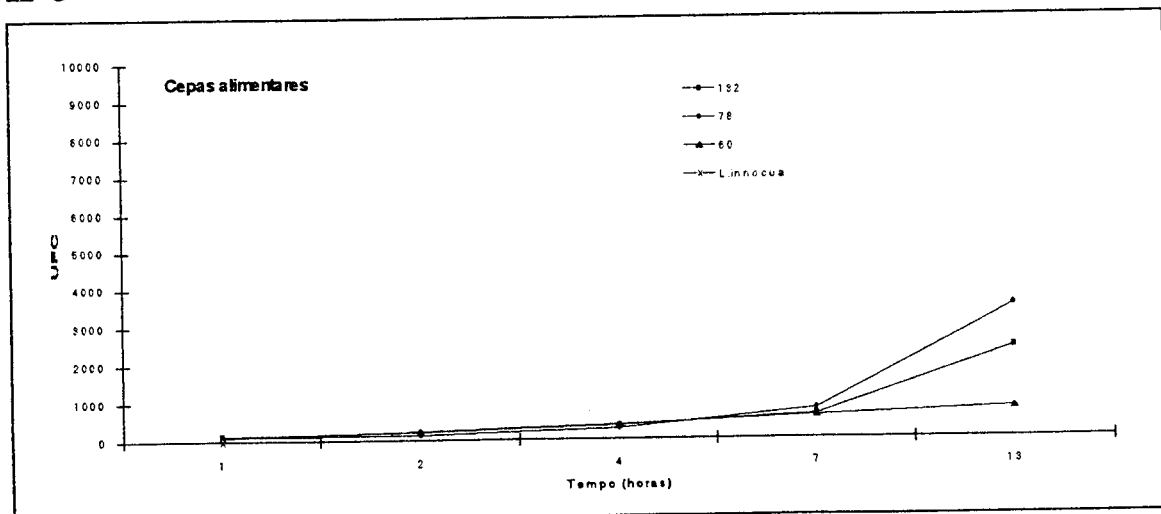
Cepa	Tempo (horas)				
	1	2	4	7	13
Scott A	130	110	110	420	5000
Ar/80	100	200	320	700	1800
600309-G	230	400	400	610	850
HSE	300	400	520	780	1500
132	140	220	380	640	2400
78	120	150	300	790	3500
60	100	240	400	600	800
L.innocua	10	30	0	0	0

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

22°C



22°C

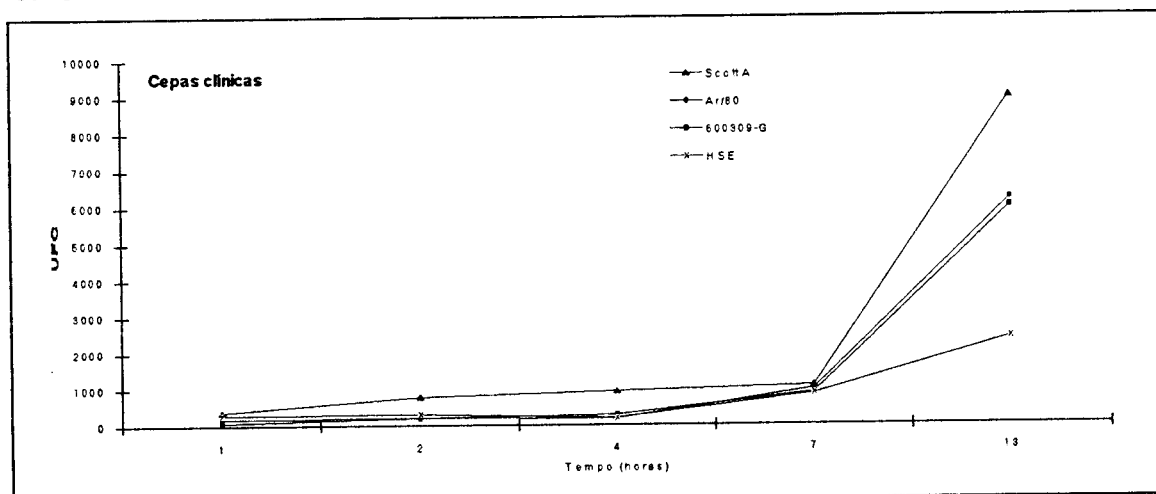


QUADRO 5 - Número de células bacterianas, cultivadas a 37°C, no interior de macrófagos após uma, duas, quatro, sete e treze horas de inoculação.

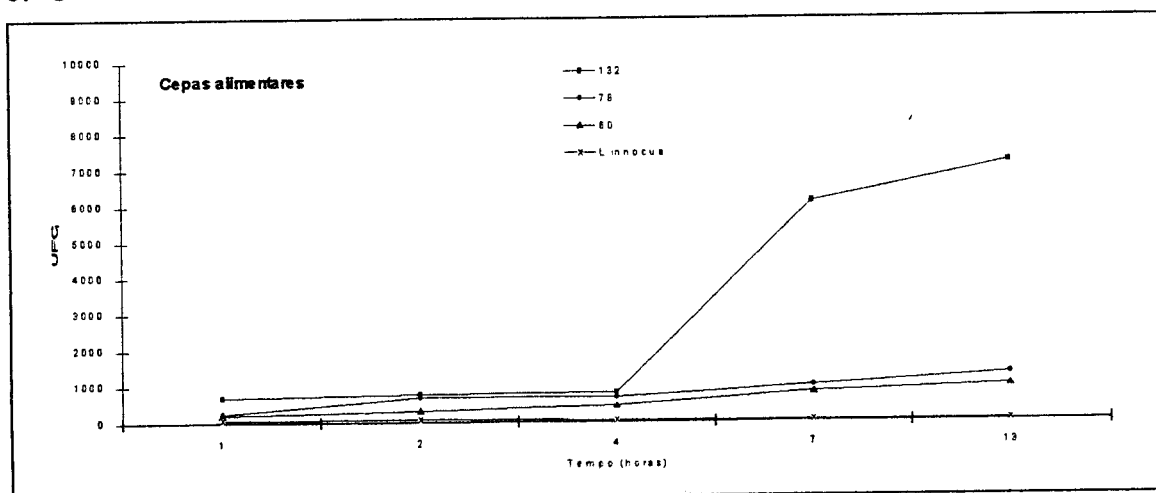
Cepa	Tempo (horas)				
	1	2	4	7	13
Scott A	400	800	950	1100	9000
Ar/80	100	210	200	1000	6200
600309-G	200	210	300	900	6000
HSE	300	320	220	870	2400
132	690	770	810	6100	7200
78	240	680	680	980	1300
60	200	320	450	810	980
L.innocua	70	80	43	30	31

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

37°C



37°C



Assim, podemos observar que às três temperaturas, as cepas clínicas aceleraram a multiplicação no intervalo de 7 a 13 horas, com exceção da Scott A a 4°C que se acelerou a partir da quarta hora. A cepa HSE apresentou cinética mais próxima das alimentares do que das demais cepas do grupo das clínicas a qual pertence.

De modo geral, as cepas alimentares também aceleraram a multiplicação no período de 7 a 13 horas, sendo exceção a cepa 132 a 37°C (Quadro 4) que se acelerou a partir da quarta hora. Nessa temperatura, ainda, verificamos que as demais cepas alimentares mantiveram crescimento praticamente uniforme.

Observando as cepas a 22°C, constatamos que a diferença entre os grupos de clínicas e alimentares foi irrisória com exceção da Scott A que destacou-se das demais cepas (Quadro 3) apresentando aumento de 11,9 vezes UFC no intervalo de 7 a 13 horas.

A *Listeria innocua*, ao contrário de outras cepas, não apresentou multiplicação intracelular em nenhuma das temperaturas ensaiadas, o que era esperado, pois a *Listeria innocua* é tida como não hemolítica (SEELIGER & JONES, 1986). Alguns estudos têm demonstrado que a hemolisina secretada pela *Listeria*, listerolisina O, é imprescindível na multiplicação dessa bactéria em tecidos (GAILLARD et alii, 1987; PORTNOY et alii, 1988).

Encontramos na literatura um trabalho semelhante ao nosso, realizado por GAILLARD et alii (1987). Esses autores estudaram "in vitro" o crescimento do intestino Caco-2, acompanhando a multiplicação por 18 horas.

Notaram os autores do trabalho citado que a cinética da infecção em Caco-2 foi muito similar para as cinco cepas ensaiadas, havendo multiplicação bastante acelerada no período de 2 a 8 horas (aumento de 14 vezes no número de UFC).

Podemos comparar o ensaio de GAILLARD et alii (1987), no período de 2 a 8 horas com o nosso ensaio no período de 2 a 7 horas a 37°C.

Neste intervalo de tempo, as cepas do nosso experimento se multiplicaram apenas de 1,3 a 4,7 vezes. A cepa 132, entretanto, apresentou um aumento de 7,9 vezes no número de UFC. Contudo, esse número está bem abaixo do valor de aumento (14 vezes) encontrado pelos outros autores.

O período de aceleração de crescimento, que no estudo de GAILLARD et alli (1987), ocorreu de 2 a 8 horas, no nosso ensaio, entretanto, aconteceu de 7 a 13 horas, aliás, coincidentemente o mesmo intervalo de 6 horas. O aumento de UFC verificado em nossas cepas foi de 2,7 a 8,1 vezes para as cepas clínicas; já as alimentares, com exceção da 132, apresentaram, conforme já dissemos, crescimento intracelular uniforme. Mesmo nesse período de aceleração, os valores (2,7 a 8,1 vezes) estão bem abaixo do valor (14 vezes) encontrado por GAILLARD et alli (1987).

Não obstante termos trabalhado com linhagens de células distintas, percebemos que nos dois trabalhos o período de crescimento intracelular acelerado durou 6 horas.

Marcamos como limite no nosso trabalho, o acompanhamento até a 13^a. hora, pois a partir desse período tornou-se difícil a realização da contagem das bactérias devido a desintegração dos macrófagos.

No ensaio dos outros autores, essa desintegração começou ocorrer a partir da 8^a. hora havendo, portanto, diminuição gradativa na contagem intracelular das bactérias a partir desse momento.

5.5. DOSE LETAL 50% PARA EMBRIÕES DE GALINHA

No que se refere à determinação da DL₅₀ em ovos embrionados de galinha, constatamos que de modo geral as cepas clínicas foram mais patogênicas, apresentando DL₅₀ menor que as cepas alimentares, conforme podemos verificar na Tabela 7.

TABELA 7 - Doses letais 50% (DL₅₀) de *L. monocytogenes* cultivadas a 4, 22 e 37°C para ovos embrionados de galinha, obtidos pela média de seis repetições de teste.

Cepa	Temperatura [°C] de cultivo		
	4	22	37
Scott A	1,33	4,41	4,83
Ar / 80	1,92	6,17	6,87
600309-G	2,15	9,42	10,00
HSE	1,13	6,15	6,31
132	1,65	7,75	8,27
78	2,83	8,30	8,15
60	2,25	7,17	8,41
<i>L. innocua</i>	>10	>10	>10

Valores expressos em unidades formadoras de colônias

Observando atentamente os resultados acima, verificamos que o crescimento das cepas a 4°C determinou maior patogenicidade tanto para as cepas clínicas quanto para as alimentares.

JAEGER & MEYERS (1954), inoculando *L. monocytogenes* em camundongos, cobaias e embriões de galinha, encontraram que culturas crescidas entre 25 e 5°C foram antigênicamente mais ativas e tiveram aumento de virulência quando comparadas com culturas crescidas a 37°C, o que reforça os resultados por nós obtidos.

Resultados semelhantes foram encontrados por WOOD & WOODBINE (1979) que trabalhando com duas cepas, NCTC 5214 e NCTC 5105 crescidas a 4, 22 e 37°C, verificaram que a cepa NCTC 5214 foi mais virulenta quando crescida à temperaturas mais baixas, 4 e 22°C, produzindo um significativo aumento de 60% de mortalidade, quando comparada com a cepa de controle.

Objetivando examinar a hemolisina produzida por *L. monocytogenes* a 4 e 37°C em ovos embrionados de galinha, BASHER et alii (1984) trabalharam com as cepas NCTC 5214 e 4379, e demonstraram a ocorrência de aumento na mortalidade e efeitos mais tóxicos nos tecidos dos embriões, quando as cepas foram

cultivadas a 4°C, o que corrobora os resultados de WOOD & WOODBINE (1979).

A mortalidade com hemolisina de cultivo a 4°C, comparada com hemolisina de cultivo a 37°C, foi duas vezes maior para a cepa 4379 e três vezes maior para a NCTC 5214. Relatam ainda esses autores que a DL₅₀ para o hemolisina purificada produzida pela cepa 4379 a 37°C foi 446 UFC, enquanto a 4°C foi 246 UFC.

Mais recentemente, CZUPRYNSKI et alii (1989) também relataram que o crescimento de *L. monocytogenes* à temperatura reduzida (4°C) aumentou a virulência em camundongos inoculados intravenosamente, embora não tivesse afetado camundongos inoculados por via oral.

Na realidade não se conhece totalmente os mecanismos que a bactéria desenvolve a esta temperatura que a torne mais virulenta. Segundo (GIRARD et alii, 1963; KHAN, 1973) ela produziria mais hemolisina quando cultivada à temperaturas mais baixas, aumentando assim a sua virulência.

KATHARIOU & PINE (1990), noticiaram que à temperaturas reduzidas *L. monocytogenes* produziria algumas proteínas extracelulares, incluindo polipeptídeos de massa molecular aproximada de 72 KDa e 30 KDa, que não produziria a 37°C. Contudo, não associou-se essas proteínas à virulência da mesma.

Retomando a análise da Tabela 7, observamos que a DL₅₀ das cepas crescidas a 22°C foi bem próxima às das cepas cultivadas a 37°C; ambas mostram patogenicidade bastante reduzida quando comparadas com a DL₅₀ a 4°C.

SCHÖENBERG (1989), cita a DL₅₀ em embrião de galinha como sendo menor do que $6,0 \times 10^2$ células para cepas virulentas. Mesmo entendendo que esse valor não possa ser considerado absoluto, pois a DL₅₀, além das cepas, depende da susceptibilidade dos embriões, concordamos que este valor está bem abaixo da DL₅₀ por nós encontrada a 22 e 37°C.

De fato, se formos comparar o resultado do autor com os resultados por nós obtidos a 22 e 37°C, verificamos que as cepas cultivadas e mantidas à essas temperaturas tiveram realmente baixa patogenicidade.

Isto poderia ser explicado pela provável queda de virulência devido os repiques sucessivos das cepas em meio de cultura, até o momento de seu uso no experimento.

Analisando agora as cepas individualmente, observamos que das clínicas cultivadas a 4°C, a mais patogênica foi a HSE, enquanto a cepa 600309-G foi a menos patogênica com DL₅₀ bem próximo das alimentares; já do grupo das alimentares a 4°C, destacam-se a cepa 132 com DL₅₀ próxima ao grupo das clínicas.

O fato mais relevante neste tópico é a constatação de que a 4°C as cepas de *L. monocytogenes* mantiveram a sua virulência durante o período de armazenamento em laboratório.

Isto nos permitiria supor que alimentos contaminados mantidos sob refrigeração poderiam estar preservando a virulência dessas cepas.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista as condições experimentais do nosso trabalho, podemos concluir que:

- Cultivos de macrófagos, células Vero e ovos embrionários de galinha se prestaram como modelos para o estudo de invasão, multiplicação e virulência de *L. monocytogenes*.
- A invasão e multiplicação de *L. monocytogenes* foi mais efetiva em macrófagos que em células Vero.
- A invasão e multiplicação de *L. monocytogenes* em cultivo de macrófagos foi dependente do tempo após inoculação e temperatura de cultivo das cepas.
- As cepas clínicas apresentaram maior capacidade de invasão e multiplicação em macrófagos que as cepas isoladas de alimentos, com exceção da cepa 132 de alimento que foi mais invasiva que as outras duas de mesma origem.
- A inoculação de *L. monocytogenes* em células Vero não serviu para diferenciar as cepas clínicas das isoladas de alimentos nem mostrou diferença entre as cepas cultivadas em diferentes temperaturas.
- Ovos embrionados se mostraram como bom modelo para medir a diferença na virulência de cepas cultivadas e mantidas em diferentes temperaturas, mas não mostraram diferença entre as cepas clínicas e as isoladas de alimentos.
- A temperatura teve efeito modulador na virulência de *L. monocytogenes* para embriões de galinha. Cepas mantidas a 4°C foram mais virulentas que as mantidas em temperaturas mais elevadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUDURIER, A.; TAYLOR, A.G.; CARBONNELLE, B.; McLAUCHLIN, J.A. A phage typing system for *Listeria monocytogenes* and its use in epidemiological studies. **Clin. Invest. Med.** 7: 229-232, 1984.
- AUDURIER, A. & MARTIN, C. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.** 8: 251-257, 1989.
- BANNISTER, B.A.. *Listeria monocytogenes* meningitis associated with eating soft cheese. **J. Infect.** 15: 165-168, 1987.
- BASHER, H.A.; FOWLER, D.R.; RODGERS, F.G.; SEAMAN, A.; WOODBINE, A. Pathogenesis and growth of *Listeria monocytogenes* in fertile hen's eggs. **Zbl. Bakt. Hyg.A** 256: 497-509, 1984.
- BEARNS, R.E. & GIRARD, K.F. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. **Can. J. Microbiol.** 4: 55-61, 1958.
- BECKERS, H.J.; SOENTORO, P.S.S.; DELFGOU-van ASCH, E.H.M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **Int. J. Food Microbiol.** 4: 249-256, 1987.
- BERCHE, P.; GAILLARD, J.L.; SANSONETTI, P.; GEOFFROY, C.; ALOUF, J.E. Towards a better understanding of the molecular mechanisms of intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** 138: 242-246, 1987.
- BIELECKY, J.; YOUNGMAN, P.; CONELLY, P.; PORTNOY, D.A. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grown in mammalian cells. **Nature. London,** 345: 175-176, 1990.
- BLUME, E. Stalking the deadly *Listeria*. **Nutr. Action Healt Lett.** 14: 7-8, 1987.

- BOËRLIN, P.; ROCOURT, J.; PIFFARETTI, J.C. Taxonomy of the genus *Listeria* by using multilocus enzyme electrophoresis. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **41**(1): 59-64, 1991.
- BOYLE, D.L.; SOFOS, J.N.; SCHMIDT, G.R. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and ground beef. **J. Food Sci.** **55**: 327-328, 1990.
- BRACKETT, R.E. & BEUCHAT, L.R. Methods and media for the isolation and cultivation of *Listeria monocytogenes* from various foods. **Int. J. Food Microbiol.** **8**(3): 219-223, 1989.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TIERNEY, J.T.; LARKIN, E.P.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. **J. Food Prot.** **48**(9): 743-745, 1985.
- BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; CORWIN, J.J.; HUNT, J.M.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **J. Food Prot.** **50**(7): 543,544-546, 1987.
- BREER, C. & SCHOPFER, K *Listeria* and food. **Lancet.** **2**(8168): 1022, 1988.
- BROOME, C.V. Epidemiology of listeriosis in the United States. Paper delivered at: World Health Organization Consultation on Prevention an Control of Listeriosis. W. Berlin, FRG, 10-12 December, 1986.
- BRYAN, F.L. Infections and intoxications caused by other bacteria. In: RIEMANN, H.R. & BRYAN, F.L. eds. **Foodborne Infections and Intoxications**. 2 ed. New York, Academic Press, 1979. p. 266-267.
- BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; ARCHER, D.L. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Food Microbiol.** **4**: 269-275, 1987.
- BUCHANAN, R.L.; STAHL, H.G.; BENCIVENGO, M.M.; CORRAL, F. Comparison of lithium-chloride-phenylethanol-moxalactam and modified Vogel-Johnson agars for detection of *Listeria spp* in retail level meats, poultry and seafood. **Appl. Environ. Microbiol.** **55**(3): 599-603, 1989.

- BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; BRADSHAW, J.G.; PEELER, J.T.; TIERNEY, J.T.; TWEDT, R.M. Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* cells suspended in raw bovine milk. **Appl. Environ. Microbiol.** **52**(6): 1398-1402, 1986.
- BUNNING, V.K.; DONNELLY, C.W.; PEELER, J.T.; BRIGGS, E.H.; BRADSHAW, J.G.; CRAWFORD, R.G.; BELIVEAU, C.M.; TIERNEY, J.T. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**(2): 364-370, 1988
- BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; TIERNEY, J.T.; PEELER, J.T. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat-shock. **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 3216-3219, 1990.
- BUNNING, V.K.; CRAWFORD, R.G.; TIERNEY, J.T.; PEELER, J.T. Thermotolerance of heat-shocked *Listeria monocytogenes* in milk exposed to high-temperature, short-time pasteurization. **Appl. Environ. Microbiol.** **58**: 2096-2098, 1992.
- CAMILLI, A. & PORTNOY, D. A. Isolation of *Listeria monocytogenes* mutants defective for intracellular growth. **Astr. Annu. Meet Am. Soc. Microbiol.**, B-6, p.30, 1988.
- CAMILLI, A. H.; GOLDFINE, H.; PORTNOY, D. A. *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. **J. Exp. Med.** **173**: 751-754, 1991.
- CAMPBELL, D. M. Listeriosis in Scotland, 1988. **Lancet** **1**(8636):492, 1989.
- CANADA. Health and Welfare. Listeriosis in Nova Scotia, 1981. **Can. Dis. Wkly. Rep.** **7**(35): 173-175, 1981a.
- CANADA. Health and Welfare. Listeriosis - Atlantic Provinces. **Can. Dis. Wkly. Rep.** **7**(52): 257-263, 1981b.
- CANTONI, C.; COMI, G.; VALENTI, M. Attualità su *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Ind. Aliment.** **27**(258): 266-268, 1988a.
- CANTONI, C.; VALENTI, M.; COMI, G. *Listeria* in formaggi e in salumi. **Ind. Aliment.** **27**(264): 859-861, 1988b.

- CASSIDAY, P. K.; BRAKETT, R. E.; BEUCHART, L. R. Evaluation of ten selective direct plating media for enumeration of *Listeria monocytogenes* in hams and oysters. **Food Microbiol.** **6**: 113-125, 1989.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL (USA). Listeriosis outbreak associated with mexican-style cheese - California. **Morbid. Mortal. Wkly. Rep.** **34**(24): 357-359, 1985.
- CHOI, H. K.; SCHAACK, M. M.; MARTH, E. W. Survival of *Listeria monocytogenes* in cultured buttermilk and yogurt. **Milchwissenschaft** **43**(12): 790-792, 1988.
- COMI, G. & CANTONI, C. *Listeria* in polli macellati. **Ind. Aliment.** **24**(227): 521-525, 1985.
- COMI, G.; CANTONI, C.; d'AUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Ind. Aliment.** **26**(247): 216-218, 1987.
- COMI, G. & CANTONI, C. Alcuni aspetti della presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Ind. Aliment.** **27**(257): 104-106, 1988.
- CONLAN, W.J.; NORTH, R.J. Early pathogenesis of infection in the liver with facultative intracellular Bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis* and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. **Infec. Immun.** **60**: 5164-5171, 1992.
- CONNER, D. E.; BRACKETT, R. E.; BEACHAT, L. R. Effect of temperature, sodium chloride and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Appl. Environ. Microbiol.** **52**: 59-63, 1986.
- COSSART, P. The listeriolysin O gene region: a chromosomal locus crucial for the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Infection** **16** (S2): 156-160, 1988.
- COSSART, P. & MENGAUD, J. *Listeria monocytogenes* a model system for the molecular study of intracellular parasites. **Mol. Biol. Med.** **6**: 463-474, 1989.

- COSSART, P.; VICENTE, M. F.; MENGAUD, J.; BAQUERO, F. PEREZ-DIAS, J. C.; BERCHE, P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation. **Infect Immun.** **57**: 3629-3636, 1989.
- COTTIN, J.; GENTHON, H.; BIZON, C.; CARBONELLI, B. *Listeria monocytogenes* in meat from 514 cattle. **Sci. Aliments** **5** (Hors series IV): 145-149, 1985.
- COWART, R. E. Iron regulation of growth and haemolysin production by *Listeria monocytogenes*. **Annales de L'Institut. Pasteur Microbiology.** 3° forum Microbiologia, Elsevier, p. 246-248, 1987.
- COX, L. J.; KLEISS, T.; CORDIER, J. L.; CORDELLANA, C.; KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R.; SIEBENGA, A. *Listeria* spp. in food processing, non food and domestic environments. **Food Microbiol.** **6**: 49-61. 1989.
- CZUPRYNSKI, C. J.; NOEL, E. J.; DOYLE, M. P.; SCHULTZ, R D. Ingestion and killing of *Listeria monocytogenes* by blood and milk phagocytes from mastitic and normal cattle. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 812-817, 1989.
- DAVIES, J. W. ; EWAN, E. P.; VARUGHESE, P.; ACRES, S. E. *Listeria monocytogenes* infections in Canada. **Clin. Invest. Med.** **7(4)**: 315-320, 1984.
- DEL CORRAL, F. ; BUCHANAN, R. L.; BENCIVENGO, M. M.; COOKE, P. H. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. **J. Food Prot.** **53**: 1003-1009, 1990.
- DESTRO, M.T. Isolamento de *Listeria spp* e estudo de sua ocorrência em carne, leite e derivados. Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1990.
- DIJKSTRA, R. G. Het voorkomen van *Listeria monocytogenes* in darminhoud van mestkuikens. **Tijdschr. Diergeneeskd.** **103(4)**: 229-231, 1978.

- DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; SUAREZ FERNANDEZ, G.; GARAYZABAL, J. F. F.; RODRIGUEZ FERRI, E. New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments. **Appl. Environ. Microbiol.** **47(5)**: 1188-1190, 1984.
- DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F. ; VASQUEZ BOLAND, J. A.; RODRIGUEZ FERRI, E.; SUAREZ FERNANDEZ, G. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de la lait cru destiné à la consommation humaine. **Can. J. Microbiol.** **31(10)**: 938-941, 1985.
- DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F. ; VASQUEZ BOLAND, J. A.; BLANCO, J. L.; SUAREZ, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening and semi-hard cheese. **Lett. Appl. Microbiol.** **4(6)**: 125-127, 1987.
- DONALD, T. T. & CARTER, P. B. Cell-mediated immunity to intestinal infection. **Infect. Immun.** **28**: 516-523, 1980.
- DONKER-VOET, J. Serological studies on some strains of *Listeria monocytogenes*. **Tijdschr. Diergeneesk.** **82**: 341-350, 1957.
- DONKER-VOET, J.A. A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes*. **III Int. Symp. Listeriosis**, July 13-16, Bilthoven, 1966.
- DONNELLY, C. W. Historical perspectives on methodology to detect *Listeria monocytogenes*. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **71**: 644-646, 1988.
- DONNELLY, C.W.; BRIGGS, E.H. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. **J. Food Prot.** **49**: 994-998, 1986.
- DONNELLY, C. W.; BRIGGS, E. H.; DONNELLY, L. S. Comparison of heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk as determined by two methods. **J. Food Prot.** **50(1)**: 14-17, 1987.
- DOYLE, M. P.; MESKE, L. M.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. **J. Food Prot.** **48(9)**: 740-742, 1985.

- DOYLE, M. P.; GLASS, K. A.; BEERY, J. T.; GARCIA, G. A.; POLLARD, D. J.; SCHULTZ, R. D. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. **Appl. Environ. Microbiol.** **53**(7): 1433-1438, 1987.
- DOYLE, M. P. & SCHOENI, J. L. Selective enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biologic specimens. **Appl. Environ. Microbiol.** **51**(5): 1127-1129, 1986.
- DURST, J. The role of temperature factors in the epidemiology of listeriosis. **ZBL. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A** **233**: 72, 1975.
- DURST, J. & BERENCSI, G. Data about listeriosis in Hungary. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p. 106-111. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
- EL-GAZZAR, F. E. & MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products, and dairy ingredients: a review I. *Listeria monocytogenes*, listeriosis and reponses of the pathogen to environmental conditions. **Milchwissenschaft** **46**: 14-29, 1991.
- ENGEL, R. E.; ADAMS, C. E.; CRAWFOR, L. M. Foodborne listeriosis: risk from meat and poultry. Food safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, Washington, DC 20250 USA, pp. 27-30, 1990.
- FARBER, J.M.; BROWN, B. E. Effect of prior shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 1584-1587, 1990.
- FARBER, J.M.; CARTER, A. O.; VARUGHESE, P. V.; ASHTON, F. E.; EWAN, E. P. Listeriosis traced to the consumption of alfafa tablete and soft cheese. **N. Engl. J. Med.** 322-338, 1990.
- FARBER, J.M.; DALEY, E.; COATES, F. EMMONS, D. B.; McKELLAR, R. Factors influencing survival of *Listeria monocytogenes* in milk in a high-temperature short-time pasteurizer. **J. Food Prot.** **55**: 946-951, 1992.
- FARBER, J.M.; HUGHES, A.; HOLLEY, R.; BROWN, B. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in sausage meat. **Acta Microbiol. Hung.** **36**: 273-275, 1989.

- FARBER, J.M.; JOHNSTON, M. A.; PURVIS, U.; LOITT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. **Int. J. Food Microbiol.** **52(2)**: 157-163, 1987.
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; MALCOLM, S. A. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. **Can. J. Microbiol.** **34(2)**: 95-100, 1988a.
- FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; SPEIRS, J. I.; D'AOUST, J. Y.; EMMONS, D. B.; MCKELLAR, R. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated raw milk. **Int. J. Food Microbiol.** **7(4)**: 277-286, 1988b.
- FARBER, J. M. & SPEIRS, J. I.. Potencial use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. **J. Clin. Microbiol.** **25**: 1463-1466, 1987.
- FARBER, J.M. & PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews** **55**: 476-511, 1991.
- FDA is investigating deaths linked to mexican-style cheese. **Food Chem. News** **17** jun:42, 1985.
- FEDIO, W. M.; JACKSON, H. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** **9**: 157-160, 1989.
- FENLON, D. R. Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. **Vet. Rec.** **118(9)**: 240-242, 1986.
- FENLON, D. R. & WILSON, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk from farm bulk tanks in north-east Scotland. **J. Appl. Bacteriol.** **66(3)**: 191-196, 1989.
- FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.; DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; VASQUEZ BOLAND, J.A.; BLANCO CANCELO, J.L; SUAREZ FERNANDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. **Can. J. Microbiol.** **32(2)**: 149-150, 1986.

- FERNANDEZ GARAYZABAL, J.F.; DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; VASQUEZ BOLAND, J.A.; RODRIGUEZ FERRI, E.F.; BRIONES DIESTE, V.; BLANCO CANCELO, J.L; SUAREZ FERNANDEZ, G. Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot plant size pasteurizer. **J. Appl. Bacteriol.** **63**(6): 533-537, 1987.
- FIEDLER, F. Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view. **Infection.** **16**(Suppl. 2): S92-S97, 1988.
- FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MacDONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOLMES, M.B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A.L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **N. Engl. J. Med.** **312**(7): 404-407, 1985.
- FLORIDA. Studies show USDA listeria method superior to FDA method. **Food Chem. News.** 12 oct: 4, 1987.
- FOODBORNE LISTERIOSIS (Ed. MILLER, A.J.; SMITH, J.L.; SONKUTI, G.A.). **Society for Industrial Microbiology**, Elsevier, New York, 1990.
- FREITAG, N.E.; YOUNGMAN, P.; PORTNOY, D.A. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. **J. of Bacteriol.** **174**: 1293-1298, 1992.
- GAILLARD, J. L. BERCHE, P.; SANSONETTI, P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** **52**: 50-55, 1986.
- GAILLARD, J. L. BERCHE, P.; MOUNIER, J.; RICHARD, S.; SANSONETTI, P. In vitro Model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infect. Immun.** **52**: 1987. (?)
- GALSWORTHY, S. B. Role of the cell surface in virulence of *Listeria monocytogenes*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** **138**: 273-276, 1987.
- GELLIN, B.G.; BROOME, C. V.; BIBB, W. F.; WEAVER, R. E.; GAVENTA, S.; MASCOLA, L. and the *Listeriosis* Study Group. The epidemiology of of listeriosis in the United States - 1986. **Am. J. Epidemiol.** **133**: 392-401, 1991.

- GEOFFROY, C.; GAILLARD, J.; ALOUF, J. E.; BERCHE, P. Purification, characterization and toxicology of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** **55**: 1641-1646, 1987.
- GEOFFROY, C.; RAVENEAU, J.; BERETTI, J.; LECROISEY, A.; VASQUES-BOLAN, J.; ALOUF, J. E.; BERCHE, P. Purification and characterization of an extracellular 29-Kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** **59**: 2382-2388, 1991.
- GEVENICH, H. H.; MUELLER, H. E.; SCHRITTEN-BRUNNER, A.; SEELIGER, H. P. R. The occurrence of different *Listeria* species in municipal waste water. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. B.** **81**(6): 563-565, 1985.
- GILBERT, R. J. & PINI, P. N. Listeriosis and food-borne transmission. **Lancet** **1**(8583): 472-473, 1988.
- GIRARD, K. F.; SBARRA, A. J.; BARDAWIL, W. A. Serology of *Listeria monocytogenes*. **J. Bacteriol.** **85**: 349-355, 1963.
- GITTER, M. *Listeria monocytogenes* in "oven ready" poultry. **Vet. Rec.** **99**(17): 336, 1976.
- GODFREY, R. W. & WILDER, M. S. Generation of oxygen species and virulence of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** **47**: 837-839, 1985.
- GOEBEL, W. KATHARIOU, S.; HACKER, J.; CHAKRABORTY, T.; LEIMEISTER-WÄCHTER, M. LUDWIG, A.; HESS, J.; KUHN, M.; WAGNER, W. Bacterial cytolysins as virulence factors. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Abt. 1 Suppl.** **17**: 325-355, 1988.
- GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Direct plating technique for enumeration of *Listeria monocytogenes* in food. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **71**(3): 647-650, 1988a.
- GOLDEN, D. A.; BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Evaluation of selective direct plating media for their suitability to recover uninjured, heat-injured, and freeze injured *Listeria monocytogenes* from foods. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**(6): 1451-146, 1988b.

- GOUET, P.; LABADIE, J.; SERRATORE, C. Development of *Listeria monocytogenes* in monoxenic and polyxenic beed minces. **Zentralbl. Bakteriол. Hyg. Abt. 1** 166(1): 87-94, 1978.
- GRAY, M. L. & KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriol. Rev.** 30(2): 309-382, 1966.
- GREGORIO, S. B. & EVELAND, W. C. Isolation of *Listeria monocytogenes* from inapparent sources in Michigan. In: WOODBINE, M.ed. Problems of listeriosis. Leicester, Leicester University Press, 1975. p. 87-93. **Proc. Int. Sym.** 6. sept 1974.
- HAHN, H.; NÄHER, H. Protection against facultative intracellular bacteria- role of macrophage activation and granuloma formation. **Infection** 13, 1985.
- HAO, D. Y. Y.; BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. **Appl. Environ. Microbiol.** 53(5): 955-957, 1987.
- HARTMANN, U.; FRIEDRICH, K.; BEYER, F.; TERPLAN, G. (Improved identification of *Listeria* through a moxalactam-containing medium). **Dtsch. Molk.Ztg.** 109(38): 1164-1166, 1988.
- HARVEY, P. C. & FABER. Studies on the listerella group. I. Biochemical and hemolytic reactions. **Journal of Bacteriology.** 42: 677-687, 1941.
- HAUF, N.; GOEBEL, W.; SERFLING, E.; KUHN, M. *Listeria monocytogenes* infection enhances transcription factor NF-KB in P 388 D macrophage-like cells. **Infect. Immun.** 2740-2747, 1994.
- HAVEL, E. A. Syntesis and secretion of interferon by murines fibroblast in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immunol.** 54: 787-792, 1986.
- HAYES, P. S.; FEELEY, J. C.; GRAVES, L. M.; AJELLO, G. W.; FLEMING, D. W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Appl. Environ. Microbiol.** 51(2): 438-440, 1986.

- HEISICK, J. E.; HARREL, F. M.; PETERSON, E. H.; McLAUGHLIN, S.; WAGNER, D. E.; WESLEY, I. V.; BRYNER, J. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp in foods. **J. Food Prot.** **52**(3): 154-157, 1989a.
- HEISICK, J. E.; WAGNER, D. E.; NIERMAN, M. L.; PEELER, J. T. *Listeria* spp found on fresh market produce. **Appl. Environ. Microbiol.** **55**(8): 1925-1927, 1989b.
- HIRD, D. W. Review of evidence for zoonotic listeriosis. **J. Food Prot.** **50**(5): 429-433, 1987.
- HO, J. L.; SHANDS, K. N.; FRIEDLAND, G.; ECKIND, P.; FARSEER, D. W. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infections involving patients from eight Boston hospitals. **Arch. Int. Med.** **146**: 520-524, 1986.
- HOF, H. Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2 a. **Med. Microbiol. Immunol.** **173**: 207-218, 1984.
- HOFER, E. Pesquisa de *Listeria* spp em vegetal consumido pelo homem. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 6 Salvador, Bahia, 1975a. **Anais p.192**.
- HOFER, E. Isolamento e caracterização de *Listeria monocytogenes* em água de esgoto. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **73** (1/2): 31-38, 1975b.
- HOFER, E. Bacteriologic and epidemiologic studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in healthy cattles. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. A.** **256**: 175-183, 1983.
- HOFER, E. & PÓVOA, M. M. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em solos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** **79**(1): 45-53, 1984.
- HYSLOP, N. G. & OSBORNE, A. D. Listeriosis: a potential danger to public health. **Vet. Rec.** **71**: 082-1091, 1959.
- JACCUET, CH.; BELLE, J.; ROCOURT, J. Typing of *Listeria monocytogenes* by restriction polymorphism of the ribosomal ribonucleic acid gene region **Zbl Bakt**, 1992.

- JAEGER, R. D.; MYERS, D. M. *Listeria monocytogenes* - a study of two strains isolated from human listeriosis. **Can. J. Microbiol.** **1**: 12-21, 1954.
- JENKINS, E. M.; NJOKU- OBI, A. N.; ADAMS, E. W. Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*. **J. Bact.** **88**: 418-424, 1964.
- JOHNSON, J. L.; DOYLE, M. P.; CASSENS, R.G. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. **Int. J. Food Microbiol.** **6**(3): 243-247, 1988.
- JOHNSON, J. L.; DOYLE, M. P.; CASSENS, R.G. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in meat and meat products: a review. **J. Food Protect.** **53**: 81-91, 1990.
- JONES, D. & SEELIGER, H. P. R. International Committee on Systematic Bacteriology - Subcommittee on the Taxonomy of *Listeria*, *Brochothrix* and *Erysipelothrix*. Minutes of the meeting, September 7-8, 1986, Manchester. **Int. J. Syst. Bacteriol.** **37**: 176, 1987.
- JUNTTILA, J. & BRANDER, M. *Listeria monocytogenes* septicemia associated with consumption of salted mushrooms. **Scand. J. Infect. Dis.** **21**: 339-342, 1989.
- JUNTTILA, J. R.; NIEMALA, S. I.; HIRN, J. Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. **J. Appl. Bacteriol.** **65**: 321-327, 1988.
- KACZMARSKI, E. B. & JONES, D. M. Listeriosis and ready-cooked chicken. **Lancet** **1**(8637): 549, 1989.
- KAMPELMACHER, E. H. & NOORLE-JANSEN, L. M. Further studies on the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. **Zentralbl. Bakteriol. Hyg. Abt. 1. Orig. A.** **221**: 70-77, 1972.
- KAMPELMACHER, E. H. & NOORLE-JANSEN, L. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in effluents. In: WOODBINE, M. ed. Problems of listeriosis. Leicester, **Leicester University Press**, 1975. p. 66-70. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974.]

- KAMPELMACHER, E. H. MASS, D. E.; NOORLE-JANSEN, L. M. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in feces of pregnant women with and without direct animal contact. **Zentralbl. Bakteriolog. Hyg. Abt. 1. Orig. A.** 234: 238-242, 1976.
- KAPPERUD, G. Studies of the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria. **Acta Path. Microbiol. Scand. Sect B** 88: 293-297, 1980.
- KARAIIOANNOGLOU, P. G. & XENOS, G. C. Survival of *Listeria monocytogenes* in meatballs. **Hell. Kteniatri.** 23(3): 111-118, 1980.
- KARCHES, H. & TEUFEL, P. (*Listeria monocytogenes*. Its occurrence in minced meat and behaviour in fresh zwiebelmettwurst sausage). **Fleischwirtschaft** 68(11): 1388-1392, 1420, 1988.
- KATHARIOU, S.; METZ, P.; HOF, H.; GORBEL, W.; Tn916 induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes* **J. Bacteriol.** 169: 1291-1297, 1987.
- KATHARIOU, S. & PINE, L. Laboratory Studies of virulence of *Listeria monocytogenes*. **Foodborne Listeriosis** p. 55-60 cap.9, 1990.
- KEER, K.; DEALLER, S. F.; LANCEY, R. W. *Listeria* in cook-chill food. **Lancet** 2(8601): 37-38, 1988a.
- KEER, K.; DEALLER, S. F.; LANCEY, R. W. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. **Lancet** 2(8620): 1133, 1988b.
- KHAN, M. A.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. *Listeria monocytogenes* haemolysin: Lecitinase. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A** 255: 66-79, 1973.
- KHAN, M. A.; NEWTON, I. A.; SEAMAN, A.; WOODBINE, M. The survival of *Listeria monocytogenes* inside and outside its host In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press. 1975. p. 75-85 [Proc. Int. Symp. 6 sept 1974].
- KNABEL, S. J.; WALKER, H. W.; HARTMAN, P. A.; MENDONÇA, A. F. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 370-376, 1990.

- KUHN, M.; KATHARIOU, S.; GOEBEL, W. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** **56**: 79-82, 1988.
- KUHN, M. & GOEBEL, W. Identification of an intracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake mammalian cells. **Infect. Immun.** **57**: 55-61, 1989.
- KUHN, M. & GOEBEL, W. Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. **Infect. Immunol.** p. 348-356, 1994.
- KVENBERG, J. E. Outbreaks of listeriosis/*Listeria* contaminated foods. **Microbiol. Sci.** **5**(12): 355-358, 1988.
- KWANTES, W & ISSAC, M. *Listeria* infection in West Glamorgan. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p. 112-114. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].
- LEIMEISTER-WÄCHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. **Mol. Microbiol.** **5**: 361-366, 1991.
- LEIMEISTER-WACHTER, M.; HAFFNER, C.; DOMANN, E.; GOEBEL, W.; CHAKRABORTY, T. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **87**: 8336-8340, 1990.
- LEISTNER, L.; SCHMIDT, U.; KAYA, M. Listerien bei fleisch und fleischerzeugnissen. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch.** Kulmbach, 28(104): 192-199, 1989.
- LIEWEN, M. B. & PLAUTZ M. W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. **J. Food Prot.** **51**(11): 840-841, 1988.
- LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **N. Engl. J. Med.** **319**, 823-828, 1988.

- LINTON, R. H.; PIERSON, M. D.; BISHOP, J. R. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. **J. Food. Prot.** **53**: 924-927, 1990.
- LISTERIOSIS transmitted by contaminated Jalisco-brand cheese. **J. Food Prot.** **49**(4): 311, 1986.
- LOESSNER, M. J.; BELL, R. H.; JAY, J. M.; SHELEF, L. A. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**(12): 3003-3007, 1988.
- LOESSNER, M. J. & BUSSE, M. Bacteriophage typing of *Listeria* species **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 1912-1918, 1990.
- LOVETT, J. *Listeria* isolation. In: USA. United States Department of Health, Education and Welfare. Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**. 6.ed. Washington, DC, 1984, Supl. 9, 1987a.
- LOVETT, J. *Listeria monocytogenes*, in Doyle, M. (ed). Foodborne Bacterial Pathogens, New York: **Marcel Dekkar Inc**: 284-310, 1989
- LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **J. Food Prot.** **50**(3): 188-192, 1987b.
- LOVETT, J. & TWEDT, R. M. *Listeria* **Food Technol.** **42**(4): 188-191, 1988.
- MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection. **J. Exp. Med.** **116**: 381-406, 1962.
- MACKEY, B. M. & BRATCHELL, N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.** **9**: 89-94, 1989.
- MACKEY, B. M.; PRITCHEL, C.; MEAD, G. C. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*: Strain differences and effects on meat type and curing salts. **Lett. Appl. Microbiol.** **10**: 251-255, 1990.
- MANEV, C.; YANAKIEVA, M.; IVANOVA, E.; SLAVOVA, R.; KIROV, R.; PLANSKI, G. Healthy bulgarians as *Listeria* carriers. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p.84-86. [Proc. Int. Symp. 6. sept 1974].

- MARTH, E. H. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.** **42**(4): 165-168, 1988.
- MARTH, E. H. & RYSER, E. T. Occurrence of *Listeria* in foods: milk and dairy foods: milk and dairy foods, in Miller, A. J. Smith, J. L. & Somkuti, G. A. (eds). Foodborne Listeriosis. New York. Elsevier: 151-164, 1990.
- MAURELLI, A. T.; BLACKMON, B.; CURTIS, ROY. Temperature-dependent expression of virulence genes in *shigella* species. **Infect. Immun.** p. 43: 195-201, 1984.
- McCLAIN, D. & LEE, W. H. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** **71**(3): 660-664, 1988.
- McLAUCHLIN, J. *Listeria monocytogenes* recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **J. Appl. Bacteriol.** **63**(1): 1-12, 1987.
- McLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **Env. J. Clin. Microbiol.** **9**: 210-213, 1990.
- MEAT industry research shows *Listeria* widespread control difficult. **Food Chem. News** 29 jun: 27-28, 1987.
- MENGAUD, J.; GEOFFROY, C.; COSSART, P. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. **Infect. Immun.** **59**: 1043-1049, 1991.
- MEYER, D. H.; BUNDUKI, M.; BELIVEAU, C. M.; DONNELLY, C. W. Differences in invasion and adherence of *Listeria monocytogenes* with mammalian gut cells. **Food Microbiol.** **9**: 115-126, 1992.
- MIELKE, M.; EHLERS, S.; HAHN, H. The role of T cell subpopulations in cell mediated immunity to facultative intracellular bacteria. **Infection** **16**: 123-127, 1988.
- MITSCHERLICH, E. & MARTH, E. H. Microbial Survival in the Environment. Berlin. **Springer-Verlag**: 221, 1984.

- MOUNIER, J. A.; RYTER, A.; COQUIS-RONDON, M.; SANSONETTI, P. J. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. **Infect. Immun.** **58**: 1048-1058, 1990.
- NÄHER, H.; SPERLING, U.; TAKACS, L; HAHN, H. Dynamics of T cells of L3T4 and LY2 phenotype within granulomas in murine listeriosis **Clin. Exp. Immunol.** **60**: 559-564, 1985a.
- NÄHER, H.; SPERLING, U.; HAHN, H. H-2K restricted granuloma formation by LY-2 T cells in antibacterial protection to facultative intracellular bacteria. **J. Immunol.** **134**: 569-572, 1985b.
- NICOLAS, J. A. Contamination of meat and meat products with *Listeria monocytogenes* in Haute-Vienne, France. **Sci. Aliments.** **5** (Hors Series IV): 175-179, 1985.
- NIEMAN, R. E. & LORBER, B. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. **Rev. Infect. Dis.** **2**: 207-227, 1980.
- NJOKU-OBI, A. N.; JENKINS, E. M.; NJOKU-OBI, J. C.; ADAMS, J.; COVINGTON, V. Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysin. **J. Bacteriol.** **86**: 1-8, 1963.
- NOTERMANS, H. W.; DUFRENNE, J. LEIMEISTER-WÄCHTER, M.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity as a marker to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. **Appl. Environ. Microbiol.** **57**: 2666-2670, 1991.
- OBIGER, G. Studies on the thermostability of the main infections agents under the conditions of pasteurization. **Arch. Lebensmittelhyg.** **27**(4): 137-144, 1976.
- OLSEN, J.A.; YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* during making and storage of butter. **Milcheissenschaft.** **43**(8): 487-489, 1988.
- OSEBOLD, J.W.; INOUYE, T. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural hosts. I. Rabbit studies. **J. Infect. Dis.** **95**: 52-66, 1954a.

- OSEBOLD, J.W.; INOUE, T. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural hosts. II. Sheep studies. **J. Infect. Dis.** **95**: 67-78, 1954b.
- PARRISIUS, J.; BHARDI, S.; ROTH, M.; TRANUM-JENSEN, J.; GOEBEL, W.; SEELIGER, H.P.R. Production of listeriolysin by beta hemolytic strains of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immunol.** **51**: 314-319, 1986.
- PATERSON, J.S. Flagellar antigens of organisms of the genus *Listerella*. **J. Pathol. Bacteriol.** **48**: 25-32, 1939.
- PATERSON, J.S. The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. **J. Pathol. Bacteriol.** **51**: 427-36, 1940.
- PEARSON, L.J.; MARTH, E.H. *Listeria monocytogenes* - threat to a safe food supply: a review. **J. Dairy Sci.** **73**: 912-928, 1990.
- PEDERSEN, K. B.; WINBLAD, S.; BITSCH, V. Studies on the interaction between different o-serotypes of *Yersinia enterocolitica* and Hela cells. **Acta Path Microbiol. Scand. Sect. B** **87**: 141-145, 1979.
- PIFFARETTI, J. M.; KRESSBUCH, M.; BANNERMAN, E.; MUSSER, J. M.; SELANDER, R. K.; ROCOURT, J. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **86**: 3818-3822, 1989.
- PINI, P.N.; GILBERT, R.J. The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chicken and soft cheeses. **Int. J. Food Microbiol.** **6**(4): 317-326, 1988a.
- PINI, P.N.; GILBERT, R.J. A comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chicken and soft cheeses. **Int. J. Food Microbiol.** **7**(4): 331-337, 1988b.
- PORTNOY, D.A.; JACKS, P.S.; HINRICHS, D.J. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Exp. Med.** **167**: 1459-1471, 1988.
- PORTNOY, D.A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infec. and Immun.** **60**: 1263-1267, 1992.

- PORTNOY, D.A.; SCHREIBER, R. D.; CONNELLY, P.; TILNEY, L. G. Interferon limits access of *Listeria monocytogenes* to the macrophage cytoplasm. **J. Exp. Med.** **170**: 2141, 1989.
- PRENTICE, G.A.; NEAVES, P. *Listeria monocytogenes* in food: its significance and methods for its detection. **Bull. Fed. Int. Lait.** **223**, 1988, 31p.
- RACZ, P.; TENNER, K.; SZIVESSY. Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa. I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells. **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.** **17**: 221-236, 1970.
- RACZ, P.; TENNER, K.; MERÓ, E. Experimental *Listeria enteritidis*. II. An electron microscopic study of the epithelia phase in experimental *Listeria* infection. **Lab. Invest.** **26**: 694-700, 1972.
- RALOVICH, B. Selective and enrichment media to isolate *Listeria*. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975. p. 86-288. (Proc. Int. Symp. 6. sept. 1974).
- RALOVICH, B. *Listeriosis Research: Present situation and perspective*. Budapest: Akademiai Kiado, 1984.
- RALOVICH, B. Data of the enrichment and selective cultivation of listeriae. **Int. J. Food Microbiol.** **8(3)**: 205-217, 1989.
- RECENT. Products recalls and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** **49(9)**: 755-756, 1986.
- REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating 50% end point. **Am. J. Hyg.** **27**: 283-285, 1938.
- RIZZO, E.; TUCHIYA, H. N.; MARTINEZ, C. H. Técnicas básicas de cultura celular. **Inst. Butantã, Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, p. 116, 1983.
- ROCOURT, J. Taxonomy of the genus *Listeria*. **Infection.** **16(Suppl. 2)**: 589-591, 1988.
- ROCOURT, J. Species of the genus *Listeria*. **Acta. Microbiol. Hung.** **36(2-3)**: 285-288, 1989.
- ROCOURT, J.; CATIMEL, B. International phage typing centre for *Listeria*: report for 1987. **Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.** **36**: 225-229, 1989.

- ROCOURT, J.; GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D.; SEELIGER, H.P.R. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato. **Curr. Microbiol.** 7: 383-388, 1982.
- ROCOURT, J.; SEELIGER, H.P.R. As haemolysin an in vitro marker of the pathogenic strains of the genus *Listeria*. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol.** 138: 277-279, 1987.
- ROSENOV, E.M.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in skin, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. **J. Food Prot.** 50(6): 452-459, 1987.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. **J. Food Prot.** 50(1): 7-13, 1987a.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. **J. Food Prot.** 50(5): 372-378, 1987b.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of brick cheese. **J. Dairy Sci.** 72: 838-853, 1989.
- RYSER, E.T.; MARTH, E.H. *Listeria*, listeriosis and Food Safety. New York: Marcell Dekker, Inc. 1991.
- SCALETSKY, I. C. A.; SILVA, M. L. M.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.** 45: (2) 534-536, 1984.
- SCHAACK, M.M.; MARTH, E.M. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. **J. Food Prot.** 51(11): 848-852, 1988.
- SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.** 308(4): 203-205, 1983.

- SCHLECH III, W.F.; LAVIGNE, P.M. New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. **Clin. Invest. Med.** 7(4): 321-324, 1984.
- SCHMIDT, U.; SEELIGER, H.P.R.; GLENN, E.; LANGER, B.; LEISTNER, L. Listerienfunde in rhen fleischerzeugnissen. **Fleischwirtschaft.** 68(10): 1313-1316, 1988.
- SCHMIDT, U. Verfahren zum nachwers von listerien in fleisch und fleischerzeugnissen. **Mitteilungsbl. Bundesanst. Fleischforsch, Kulmbach,** 28(105): 264-268, 1989.
- SCHOENBERG, A. Method to determin of *Listeria strains*. **Elsevier Science Publishers**, p. 281-284, 1989.
- SCHUCHAT, A.; LIZANO, C.; BROOME, C.V.; SWAMINATHAN, B.; KIM, C.; WINN, K. Outbreak of neonatal listeriosis associated with mineral oil. **Pediatr. Infect. Dis. J.** 10: 183-189, 1991.
- SCHULTZ, E.W. Listerella infections: a review. **Stanford Med. Bull.** 3: 135-151, 1945.
- SCHWARTS, B.; BROOME, C.V.; BROWN, G.R.; HIGHTOWER, A.W.; CIESIELSKI, C.A.; GAVENTA, S.; GELLIN, B.G.; MASCOLA, L. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. **Lancet** 2(8614): 779-782, 1988.
- SEELIGER, H.P.R. Listeriosis. New York: **Hafner Publishing Company:** 91, 96, 106, 121 p., 1961.
- SEELIGER, H.P.R. Modern taxonomy of the *Listeria* group - relationship to its pathogenicity. **Clin. Invest. Med.** 7: 217-221, 1984.
- SEELIGER, H.P.R.; HONE, K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: BERGAN, T. & NORRIS, J.R. (eds.). **Methods in Microbiology.** New York: Academic Press, 31-49, 1979.
- SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. (eds.). **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**, 9 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1235-1245.

- SHELEF, L.A. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4°C and 25°C. **J. Food Prot.** **52(6)**: 379-383, 1989.
- SIDDIQUE, I.H.; LIN, I.F.; CHUNG, R.A. Purification and characterization of hemolysin produced by *Listeria monocytogenes*. **Am. J. vet. Res.** **35**: 289-296, 1974.
- SILLIKER, J.H. *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.** **40(8)**: 24, 1986.
- SIPKA, M.; ZAKULA, S.; KOVINCIC, I.; STAJNER, B. Secretion of *Listeria monocytogenes* in cows milk and its survival in white brined cheese. In: INTERNATIONAL DAIRY CONGRESS, 19. New Delhi, 2-6 dec. 1974. New Delhi, 1974. v. 1E. p. 157.
- SKIDMORE, A.G. Listeriosis at Vancouver general Hospital, 1965-1979. **J. Can. Med. Assoc.** **125**: 1217-1221, 1981.
- SKOVGAARD, N.; MORGEN, C.A. Detection of *Listeria* spp in faeces from animals, in feeds and in raw food of animal origin. **Int. J. Food Microbiol.** **6(3)**: 229-242, 1988.
- SKOVGAARD, N.; NORRUNG, B. The incidence of *Listeria* spp in faeces of Danish pigs and in minced pork meat. **Int. J. Food Microbiol.** **8(1)**: 59-63, 1989.
- SLADE. P.J.; COLLINS-THOMPSON, D.L. Two-stage enrichment procedures for isolating *Listeria monocytogenes* from raw milk. **J. Food Prot.** **50(11)**: 904-908, 1987.
- SLADE. P.J.; COLLINS-THOMPSON, D.L.; FLETCHER, F. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.** **21(4)**: 425-429, 1988.
- SMALL, P. L. C.; ISBERG, R. R.; FALKOW, S. Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurim*, *Yersinia pseudotuberculosis*, and *Yersinia enterocolitica* to enter and replicate within Hep-2 cells, **Infect. Immun.** **55**: (7) p. 1674-1679, 1987.

- SMYTH, C.J. & DUNCAN, J.L. Thiol-activated (oxigen-labile) cytolysins in "Bacterial toxins and cell membranes". (J. Jeljaszewicz and T. Wadström) (p. 129-183). Academic Press, London, New York, 1978.
- SORRELLS, K.M.; ENGIL, D.C.; HATFIELD, J.R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** **52**: 571-573, 1989.
- STEINBRUEGGE, E.G.; MAXCY, R.B.; LIEWEN, M.B. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce. **J. Food Prot.** **51**(8): 596-599, 1988.
- SURAK, J.G.; BAREFOOT, S.F. Control of *Listeria* in the dairy plant. **Vet. Hum. Toxicol.** **29**(3): 247-249, 1987.
- SVABIC-VLAHOVIC, M.; PANTIC, D.; PAVIC. Transmission of *Listeria monocytogenes* from mother's milk to her baby and to puppies. **Lancet ii**: 1201, 1988.
- TERPLAN, G.; SCHOEN, R.; SPRINGMEYER, W.; DEGLE, I.; BECKER, H. Vorkommen, verhalten und bedeutung von listerien in milch und milchprodukten. **Arch. Lebensmittelhyg.** **37**(6): 131-137, 1986.
- THAM, W. Survival of *Listeria monocytogenes* in cheese made of unpasteurized goat milk. **Acta Vet. Scad.** **29**(2): 165-172, 1988.
- TILNEY, L.G.; PORTNOY, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **J. Cell. Biol.** **109**: 1597-1609, 1989.
- TRUSCOTT, R.B.; MCNAB, W.B. Comparison of media and procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from ground beef. **J. Food Prot.** **51**(8): 626-628, 1988.
- TWEDT, R.M. Thermal resistance characteristic of *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** **49**(10): 849, 1986.
- USA. United States Department of Agriculture. Monitoring policy on *Listeria monocytogenes* in meat and poultry. 1988. 10p. (Comunicações internas).

- Van DISSEL, J. T.; STIKKELBROECK, J. J. M.; MICHEL, B. C.; Van Den BARSELAAR, M. TH.; LEIJH, P. C. J.; Van FURTH, R.: Inability of recombinant interferon-gama to activate the antibacterial activity of mouse peritoneal macrophages against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **J. Immunol.** **139**: p. 1673-1678, 1987.
- WALKER, L.; LOWRIE, D. B.; BARCLAY, R.; DIXON, G.; SOUNDERS, K.; ANDREW, P. W. Activation of mouse peritoneal macrophages by maintenance in serun-free medium. **Immunology**, **73**: 109-113, 1991.
- WALKER, S.J.; STRINGER, M.F. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. **J. Appl. Bacteriol.** **63**: R20, 1987.
- WATKINS, J.; SLEATH, K.P. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. **J. Appl. Bacteriol.** **50**: 1-9, 1981.
- WEIS, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* on plants and soil. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975a. p. 61-65. (Proc. Int. Symp. 6. sept. 1974a).
- WEIS, J. The incidence of *Listeria monocytogenes* in domestic and wild animals in South West Germany. In: WOODBINE, M. ed. **Problems of listeriosis**. Leicester, Leicester University Press, 1975b. p. 121-126. (Proc. Int. Symp. 6. sept. 1974b).
- WEIS, J.; SEELIGER, H.P.R. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol.** **30**(1): 29-32, 1975.
- WELSHIMER, H.J. Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. **J. Bacteriol.** **95**(2): 300-303, 1968.
- WELSHIMER, H.J. The genus *Listeria* and related organisms. In: STAN, M.; STOLP, H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (eds.): **The Prokaryotes**. Springer-Verlag, Berlin pp. 1680-1687, 1981.

- WELSHIMER, H.J.; DONKER-VOET, J. *Listeria monocytogenes* in nature. **Appl. Microbiol.** **21**(3): 516-519, 1971.
- WOOD, L.V.; WOODBINE, M. Low temperature virulence of *Listeria monocytogenes* in the Avian Embryo. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.** **243**: 74-81, 1979.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Foodborne listeriosis. **Bull. WHO.** **66**(4): 421-428, 1988.
- YOUSEF, A.E.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of colby cheese. **J. Food Prot.** **51**(1): 12-15, 1988.
- YOUSEF, A.E.; RYSER, E.T.; MARTH, E.H. Methods for improved recovery of *Listeria monocytogenes* from cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** **54**(11): 2643-2649, 1988.

APÊNDICE

I - Ágar triptose com ácido nalidíxico (ATN)

Bacto triptose	20,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Dextrose	1,0g
Extrato de levedura	6,0g
Ácido nalidíxico (sol. 2%)	1,0g
Ágar	15,0g

Os componentes foram suspensos em 1000 ml de água destilada/deionizada e deixados em repouso por 15 minutos. Após aquecimento até completa dissolução, foi feita a autoclavagem a 121 °C por 15 minutos. Depois do resfriamento em banho-maria a 50°C, o meio foi vertido em placas com 100mm de diâmetro, num volume de 15ml.

A solução de ácido nalidíxico foi preparada em hidróxido de Sódio (NAOH) 0,1M. PH final 7,4 ± 0,2.

II - Ágar sangue de cavalo ou cobaia

Ágar Colúmbia - base	44,0g
Água destilada/deionizada	1000ml

O ágar foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e mantido em banho-maria a 50°C. Foi preparado uma camada base colocando 12ml do ágar fundido em placas com 100mm de diâmetro e deixado solidificar em superfície plana. Sobre esta camada foi distribuído cinco

a seis ml do mesmo ágar adicionado de 4 a 5% de sangue de cavalo ou cobaia. As placas foram estocadas em sacos plásticos, sob refrigeração.

III - Caldo vermelho de fenol (Base) para fermentação de carboidratos

Peptona	5,0g
Extrato de carne	5,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Água destilada	900ml
Solução vermelho de fenol	1ml

Foi colocado 4,5ml em tubos de 13X100mm e esterilizado a 121°C por 15 minutos. Ao meio base foi adicionado 0,5ml da solução de carboidrato esterilizado por filtração.

Xilose 5%	(concentração final 5,0%)
Manitol 10%	(concentração final 1,0%)
Ramnose 5%	(concentração final 0,5%)

IV- Caldo nitrato

Peptona de carne	8,6g
Cloreto de sódio	6,4g
Nitrato de potássio	1,5g

A autoclavagem foi feita a 121°C por 15 minutos e em seguida um volume de 5ml foi colocado em tubos de 13X100mm. PH final 7,0 ± 0,2.

V - PBS (solução tampão de salina - fosfato de Dulbecco-Vogt)

Cloreto de sódio	8,0g
Cloreto de potássio	0,2g
Fosfato de sódio dibásico	2,9g
Fosfato de sódio monobásico	0,2g
Cloreto de magnésio com 6 H ₂ O	0,1g
Cloreto de cálcio	0,1g
Água deionizada	8ml

Após ter sido confirmado o pH para 7,1, a solução foi esterilizada por filtração e conservada em geladeira.