

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Listeria monocytogenes* RESISTENTES À TETRACICLINA ISOLADAS DE ALIMENTOS EM PELOTAS-RS

LOUISE HAUBERT<sup>1</sup>; ISABELA SCHNEID<sup>2</sup>; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS<sup>3</sup>;  
SIMONE DE FÁTIMA RAUBER WURFEL<sup>4</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [louisehaubert@hotmail.com](mailto:louisehaubert@hotmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [isabelaschneid@gmail.com](mailto:isabelaschneid@gmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [maryanaiglesias@hotmail.com](mailto:maryanaiglesias@hotmail.com)

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel – [simone\\_rauber@hotmail.com](mailto:simone_rauber@hotmail.com)

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - UFPel - [wladimir.padilha2011@gmail.com](mailto:wladimir.padilha2011@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, encontrada em diversos ambientes e responsável por causar listeriose, uma doença que acomete tanto humanos como animais. Apesar de ser uma doença relativamente rara quando comparada a outros patógenos alimentares, como *Salmonella* spp., sua importância em saúde pública se dá devido as altas taxas de letalidade, em torno de 30% em casos humanos (DE VALK et al., 2005).

Ainda que seja uma bactéria ubiqüitária, cerca de 99% dos casos de listeriose ocorrem através da transmissão pelos alimentos (SCALLAN et al., 2011). Dentre eles, se destacam a carne, o leite e os vegetais como sendo as principais fontes de contaminação por *L. monocytogenes*, em que a bactéria pode sobreviver e se multiplicar, tanto em produtos crus como em produtos prontos para o consumo, mesmo quando mantidos sob refrigeração (FILIOUSIS et al., 2009).

Devido às altas taxas de letalidade nos casos de listeriose, a antibioticoterapia é necessária para o tratamento dos sintomas clínicos. Os antibióticos de escolha para o tratamento da doença são os  $\beta$ -lactâmicos, podendo estar associados com outras classes de antimicrobianos (KRAWCZYK-BALSKA et al., 2012). Por sua característica ubiqüitária, estes micro-organismos são comumente expostos a baixos níveis de antibióticos utilizados na medicina humana e animal, ocorrendo uma pressão seletiva e favorecendo a multiplicação de cepas com perfil de resistência aos antibióticos, através de mutações ou pela aquisição de elementos genéticos móveis (BERTSCH et al., 2013).

Um crescente percentual de *L. monocytogenes* resistentes à tetraciclina vem sendo relatado entre isolados de produtos cárneos, o que pode ocorrer devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos na produção animal (SRINIVASAN et al., 2005).

A avaliação do perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos pode ser realizada através de testes de suscetibilidade a antibióticos, pela técnica de disco-difusão ou, ainda, pela avaliação da concentração inibitória mínima. No entanto, técnicas moleculares podem confirmar a presença de genes envolvidos nessa resistência, e a utilização conjunta das duas técnicas é importante, haja vista que somente a presença dos genes não implica necessariamente que a bactéria seja resistente, devido a possibilidade de não haver a expressão destes genes (MICHALOVA et al., 2004).

Diferentes mecanismos estão envolvidos na aquisição de resistência à tetraciclina por *L. monocytogenes*, sendo que os mais estudados são os que envolvem a proteção ribossomal, conferida pela presença dos genes *tetM*, *tetO* e

*tetS*, e o sistema de bomba de efluxo, adquirida pelos genes *tetK* e *tetL* (RIZZOTI et al., 2009).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo caracterizar, feno e genotipicamente, *L. monocytogenes* isoladas de alimentos em Pelotas-RS, quanto a resistência à tetraciclina.

## 2. METODOLOGIA

Vinte e cinco isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos comercializados em Pelotas, RS, foram avaliados quanto à resistência a tetraciclina, pelo método de disco-difusão, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os isolados que apresentaram resistência fenotípica à tetraciclina, foram submetidos à caracterização genotípica, através da técnica Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para a detecção dos genes *tetK* (360pb) (STROMMINGER et al., 2003), *tetL* (1028pb) (PANG et al., 1994), *tetM* (158pb) (STROMMINGER et al., 2003), *tetO* (781pb) (LI et al., 2007) e *tetS* (573pb) (LI et al., 2007). Somente um isolado apresentou resistência à tetraciclina pelo método de disco-difusão, onde foi repicado para TSB (Tryptic Soy Broth) (Oxoid®) e incubado a 37°C por 24 horas para realização da extração de DNA genômico, de acordo com o protocolo proposto por SAMBROOK & RUSSEL (2001), com adaptações. O DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o Eppendorf BioSpectrometer kinetic® (Eppendorf). Após a quantificação do DNA, a amostra foi submetida à técnica de PCR no termociclador MJ Research PTC 100.

Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega), 25 pmol para os *primers forward* e *reverse tetK* e *tetM*, 10pmol para os *primers forward* e *reverse tetS*, *tetO* e *tetL*, 10 ng de DNA para os genes *tetK* e *tetM* e 25 ng de DNA para os genes *tetS*, *tetO* e *tetL* e água ultrapura para um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação para os genes *tetK* e *tetM* foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55°C por 30 s e extensão a 72°C por 30 s, com extensão final a 72°C por 4 min. As condições de amplificação para os genes *tetS* e *tetO* foram: 95°C por 5 min para desnaturação inicial seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min e 72°C por 10 min para a extensão final. Para o gene *tetL*, a PCR foi realizada com os seguintes ciclos: 95°C por 3 min para desnaturação inicial, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 20 s, 45°C por 30 s, 72°C por 30 s e 72°C por 2 min para a extensão final.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em transiluminador (Loccus®).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a resistência a antimicrobianos seja rara em *L. monocytogenes*, o primeiro relato foi descrito em 1988, onde um isolado clínico de um paciente com meningite mostrou-se resistente para cloranfenicol, eritromicina, estreptomina e tetraciclina (POYART-SALMERON et al., 1990). Desde então, relatos de resistência a antimicrobianos desse micro-organismo e outras espécies de *Listeria* têm aumentado.

São vários mecanismos que podem levar uma bactéria a se tornar resistente: produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o

inativo; alteração do alvo; diminuição da permeabilidade à entrada do antibacteriano; síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano e expulsão do antibacteriano da célula (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

A resistência para a tetraciclina, na maioria das bactérias, é atribuída à aquisição de novos genes, geralmente associados com elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (ROBERTS, 2005). Dos 38 genes *tet* identificados até então, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* e *tetS*, são os genes mais detectados em bactérias Gram-positivas (ROBERTS, 2005).

No presente estudo, um isolado de *L. monocytogenes*, oriundo de linguiça mista frescal, mostrou-se resistente à tetraciclina pelo método de disco-difusão e carregava o gene *tetM*.

A presença dos genes *tetM* e *tetS* em isolados de *L. monocytogenes* resistentes à tetraciclina provenientes de alimentos foi descrita por POURSHABAN (2002). POYART-SALMERON et al. (1992) identificou a presença dos genes *tetM* em 96% dos isolados enquanto que o gene *tetL* foi identificado em somente 4% das amostras.

De acordo com CHARPENTIER et al. (1995), o gene *tetM* é o gene mais encontrado no cromossomo de espécies de *Listeria* resistentes à tetraciclina, enquanto que os genes *tetK* e *tetL* são geralmente encontrados em pequenos plasmídeos (ROBERTS, 2005). Em estudo de BERTSCH et al. (2013), o gene prevalente entre isolados de *Listeria* com resistência para tetraciclina foi o gene *tetM*, que vai de acordo com o resultado encontrado no presente estudo.

#### 4. CONCLUSÕES

Apesar da suscetibilidade de *L. monocytogenes* a vários antimicrobianos, isolados de alimentos podem apresentar diferentes perfis de resistência e sensibilidade aos antibióticos. No presente estudo, foi identificado um isolado com perfil fenotípico de resistência à tetraciclina, carregando o gene *tetM*. Tendo em vista a ampla disseminação do micro-organismo, os genes podem ser transferidos, através de elementos genéticos móveis, como transposons e plasmídeos, para outras bactérias, gerando implicações clínicas para o hospedeiro e para a população que entrar em contato com esses patógenos resistentes, afetando inclusive o tratamento de listeriose.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERTSCH, D.; MUELLI, M.; WELLER, M.; URUTY, A.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance gene transfer analysis of foodborne, clinical, and environmental *Listeria* spp. Isolates including *Listeria monocytogenes*. **MicrobiologyOpen**, v. 3, p.118-127, 2013.
- CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; COURVALIN, P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Journal Infectious Diseases**, v. 172, 277-281, 1995.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Eleventh Edition**. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2012.

- DE VALK, H.; JACQUET, C.; GOULET, V.; VAILLANT, V.; PERRA A.; SIMON, F. Surveillance of listeria infections in Europe. **Eurosurveillance**, v. 10, p. 251-255, 2005.
- FILIOUSIS, G.; JOHANSSON, A.; FREY, J.; PERRETEN, V. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. **Food Control**, v.20, p.314-317, 2009.
- KRAWCZYC-BALSKA, A., MARCHLEWICZ, J., DUDEK, D., WASIAK, K., SAMLUK, A. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator  $\beta$ -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. **BMC Microbiology**, v.12, p. 278, 2012.
- LI, Q.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Antimicrobial resistance of *Listeria* spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p.86-91, 2007.
- MICHALOVA, E.; NOVOTONA, P.; SCHLEGELOVA, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. **Veterinary Medicine Czech**, v.49, p. 79-100, 2004.
- PANG, Y.; BOSH, T.; ROBERTS, M.C. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular Cell**, v. 8, p.417-422, 1994.
- POURSHABAN, M.; FERRINI, A.M.; MANNONI, V. Transferable tetracycline resistance in *Listeria monocytogenes* from food in Italy. **Journal Medicine Microbiology**, v. 51, p. 564-566, 2002.
- POYART-SALMERON, C., CARLIER, C., TRIEU-CUOT, P., COURTIEU, A.L., COURVALIN, P. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **The Lancet** v. 335, p. 1422-1426, 1990.
- POYART-SALMERON, C.; TRIEU-CUOT, P.; CARLIER, C. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. **Antimicrobial Agentes Chemother**, v. 36, p. 463-466, 1992.
- RIZZOTTI, L.; LA GIOIA, F.; DELLAGLIO, F. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene tet(M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 96, p. 43-52, 2009.
- ROBERTS, M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 195-203, 2005.
- SAMBROOK, J. RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. v.1, 2001.
- SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON, M.A; ROY, S. L. Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. **Emergency Infectious Diseases**, v. 17, p. 7-15, 2011.
- SRINIVASAN, V.; NAM, H.M.; NGUYEN, L.T.; TAMILSELVAM, B.; MURINDA, S.E.; OLIVER, S.P. Prevalence of Antimicrobial Resistance Genes in *Listeria monyotogenes* Isolated from Dairy Farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.2, p.201-211, 2005.
- STROMMINGER, B.; KETTLIZ, C.; WERNER, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4089-94, 2003.
- TRABULSI, L.R; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.