

## EXPRESSÃO DOS GENES *agrA* e *agrB* EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* NA FORMAÇÃO DE BIOFILME EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOX

TATIANE KUKA VALENTE GANDRA<sup>1</sup>; NACIELE MARINI<sup>2</sup>; CAROLINE PEIXOTO BASTOS<sup>2</sup>; DARLA SILVEIRA VOLCAN<sup>2</sup>; ANTÔNIO COSTA DE OLIVEIRA<sup>2</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – tkvgandra@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – nacymarini@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolpebastos@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – darlavolcan@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – acostol@terra.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é um micro-organismo patogênico que causa a listeriose, uma doença de origem alimentar atípica, cuja maior importância em saúde pública é sua severidade, com alta taxa de casos fatais em grupos de risco, da ordem de 20-30% (GILBRETH et al., 2005).

Este patógeno tolera altas concentrações de sal e valores de pH relativamente baixos, podendo se multiplicar em temperaturas de refrigeração e apresentando a capacidade de formar biofilme em diferentes superfícies, tornando-se, com isso, uma das principais ameaças à segurança alimentar (UHITIL et al., 2004).

Trabalhos demonstram que *L. monocytogenes* é capaz de se aderir e formar biofilme em superfícies de contato com os alimentos, como poliestireno, vidro e aço inoxidável. Esta formação de biofilme cria problemas à indústria alimentícia uma vez que representa uma importante fonte de contaminação dos alimentos (DI BONAVENTURA et al., 2008).

Neste sentido, pesquisas recentes têm estudado a importância do *locus agr* (genes *agrABCD*) nas etapas de aderência e formação inicial de biofilmes por *L. monocytogenes*, demonstrando que mutantes de *agr* (*agr*) apresentaram menor capacidade de se aderirem em superfícies abióticas (RIEU et al., 2007).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a expressão dos genes *agrA* e *agrB* em isolados de *L. monocytogenes* aderidos em superfície de aço inox, com diferentes temperaturas e tempos de contato.

### 2. METODOLOGIA

Dois isolados de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – DCTA/FAEM/UFPEL (Tabela 1), provenientes de fontes distintas, e classificados quanto a formação de biofilme em microplaca conforme o protocolo de STEPANOVICK et al. (2007), foram avaliados quanto a expressão dos genes *agrA* e *agrB* por qPCR.

Tabela 1 – Características dos isolados de *L. monocytogenes* avaliados quando a expressão dos genes *agrA* e *agrB*.

Isolado	Sorotipo	Fonte/ Ano Isolamento	Classificação quanto a formação de biofilme
LA003	1/2a	Carcça ovina / 2001	Não formador
LA039	1/2a	Frango varejo / 2007	Formador

O mRNA dos isolados foi extraído a partir de células sob condições de formação de biofilme (CFB), conforme o protocolo proposto por RIEU et al. (2007). Cada isolado foi cultivado em cupom de aço inox de 8cm de diâmetro, inserido em placa de Petri contendo TSB-YE 1% de glicose, na concentração 0,5 de MacFarland (1/100) seguidos de cultivo a 10°C e 37°C por 8h, 12h, 24h e 48h.

Após este período, o meio de cultivo dos isolados sob CFB foi retirado e os cupons foram lavados com PBS e submetidos a secagem *overnight*. As células aderidas foram retiradas através de esfregaço em superfície com o auxílio de *swabs* esterilizados que foram inseridos em solução salina e homogeneizados em vortex por 1min.

Posteriormente, o RNA foi extraído e purificado com o *RiboPure™-Bacteria Kit* (Ambion®), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a síntese de cDNA foi realizada com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de oligonucleotídeos utilizados na qPCR estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Sequência de oligonucleotídeos para avaliação da expressão dos genes *agrA* e *agrB* por qPCR

Gene	Primer For	Primer Rev	Referência
<i>agrA</i>	GCAAGCAGAAGAACGGATTTCCAA	CGCTGTCTCAAAAAACAAGATAT	Rieu et al. (2007)
<i>agrB</i>	CGGCAGACACAGAAAGTTTG	TGCGAATGGTATTAGCAACG	

A qPCR constou de 12,5µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 1µL do cDNA (1:25), 1,5µL de primers forward e reverse (100pMol.µL<sup>-1</sup>), e água livre de nuclease em um volume total de 23µL. As amostras foram colocadas, em triplicata, em placas com capacidade para 96 reações, e cobertas com adesivo ótico. O nível de expressão gênica foi baseado no *threshold cycle* (Ct), onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador e, como controle de expressão, foi utilizado o crescimento dos isolados sob condições planctônicas a 37°C/24h.

A quantificação relativa (QR) foi calculada e os resultados normalizados foram submetidos a ANOVA, seguido do teste de média de Tukey, com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da expressão dos genes *agrA* e *agrB* em diferentes temperaturas podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2.

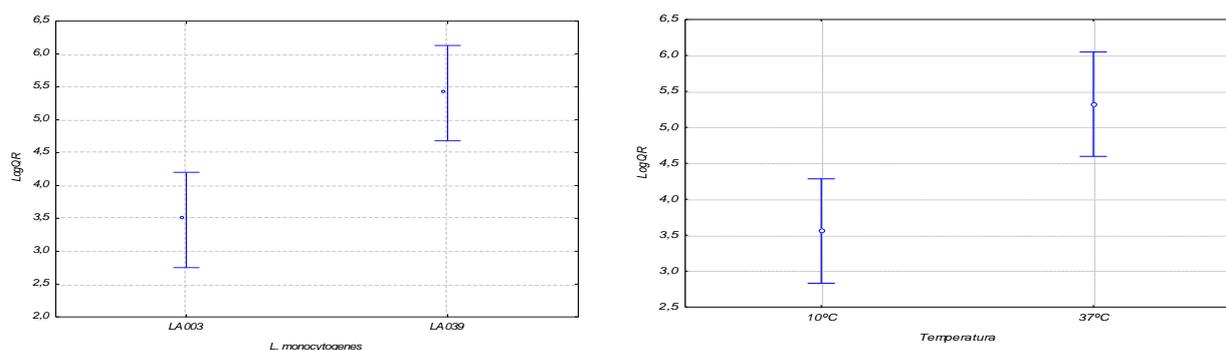


Figura 1 – Expressão dos genes *agrA* e *agrB* dos isolados em diferentes temperaturas (10°C e 37°C)

Observa-se, na Figura 1, que os genes *agrA* e *agrB* foram expressos em ambos isolados testados, sendo o *agrA*, significativamente mais expresso ( $p < 0,05$ ) do que o *agrB*. Além disso, verificou-se que, o isolado LA039 apresentou expressão significativamente maior ( $p < 0,05$ ), de ambos os genes, do que o isolado LA003. e que a temperatura de 37°C foi aquela na qual a expressão foi mais significativa ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao tempo de contato não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na expressão dos genes *agrAB*, como pode ser observado na Figura 2.

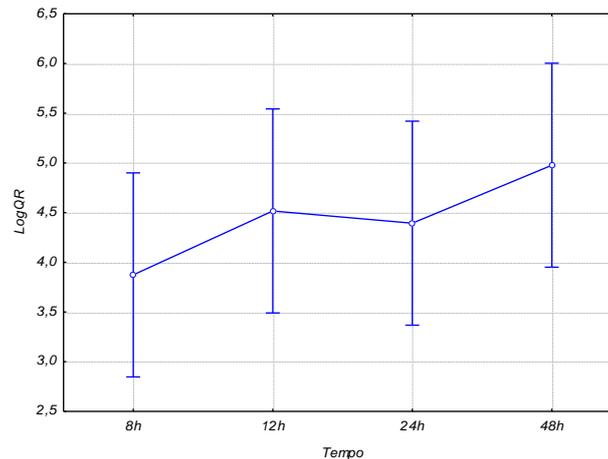


Figura 2 – Expressão dos genes *agrA* e *agrB* dos isolados de *L. monocytogenes* nos diferentes tempos de contato com aço inox (8h, 12h, 24h e 48h)

Pode-se verificar que houve diferença na expressão dos genes *agrA* e *agrB* entre os isolados, embora estes pertencessem ao mesmo sorotipo (1/2a), o que também foi observado em estudo anterior por nosso grupo, ao avaliarmos a formação de biofilme dos isolados em microplaca, considerando estes tempos de contato. Dessa forma, os resultados obtidos com a expressão gênica corroboram os resultados obtidos pelos experimentos em microplaca, onde o isolado LA003, não formador de biofilme, apresentou uma expressão significativamente menor que o LA039, formador de biofilme.

Considerando as diferentes temperaturas testadas, a 37°C, a expressão dos genes avaliados foi maior, assim como no estudo de GARMYN et al. (2012), que relatam uma diferença significativa na expressão de diversos genes, incluindo o *agrA*, em isolados de *L. monocytogenes* à temperatura de 37°C, quando comparada a temperaturas mais baixas. Os mesmos autores relatam que a temperatura pode ser um importante fator ambiental para a regulamentação da expressão do gene *agrA*.

Em relação ao tempo de contato com o aço inox, cabe ressaltar que a avaliação da expressão por qPCR ocorreu nas primeiras horas da formação de biofilme e, segundo KASNOWSKI et al. (2010), um biofilme maduro pode levar até algumas semanas para desenvolver-se, dependendo das condições do meio ambiente onde se encontra. Neste sentido, verificou-se que nestas primeiras horas de formação de biofilme, considerando a expressão dos dois genes (*agrAB*), ambos os isolados de *L. monocytogenes* se comportaram da mesma forma. A mesma tendência foi sugerida por RIEU et al. (2007), que demonstraram em cepas de *L. monocytogenes* mutantes que a transcrição desses genes do

*locus agr* parece ser importante, especialmente na fase inicial da formação do biofilme.

Entretanto mais estudos acerca dos demais genes do *locus agr* (*agrC* e *agrD*) são necessários para que se obtenha um panorama real sobre a expressão completa deste sistema, em condições de formação de biofilme.

#### 4. CONCLUSÕES

Ambos isolados de *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a sob condições de formação de biofilme expressaram os genes *agrA* e *agrB*, sendo maior a expressão do isolado classificado como formador de biofilme. Há maior expressão do gene *agrA*, além disso, há influência da temperatura, entretanto, não há influência do tempo de contato do isolado com o aço inox, sobre a expressão dos genes avaliados.

#### 5. AGRADECIMENTOS

À FAPERGS (Processo 11/1271-9) e CNPq (Processo 482524/2010-3) pelo apoio financeiro.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DI BONAVENTURA, G.; PICCOLOMINI, R.; PALUDI, D.; D'ORIO, V.; VERGARA, A.; CONTER, M.; IANIERI, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1552-1561, 2008.
- GILBRETH, S. E.; CALL, J. E.; WALLACE, F. M.; SCOTT, V. N.; CHEN, Y.; LUCHANSKY, J. D. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates Recovered from Selected Ready-To-Eat Foods and Listeriosis Patients in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8115-8122, 2005.
- GARMYN, D.; AUGAGNEUR, Y.; GAL, L.; VIVANT, A.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* Differential Transcriptome Analysis Reveals Temperature-Dependent *agr* Regulation and Suggests Overlaps with Other Regulons. **PLOS ONE**, v. 7, 2012
- KASNOWSKI, M. C. ; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 15, 2010.
- RIEU, A., WEIDMANN, S., GARMYN, D., PIVETEAU, P., GUZZO, J. *agr* system of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6125-6133, 2007.
- STATSOFT, Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual. Tulsa: **StatSoft**, Inc., 2004.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci **Journal Compilation**, 115: 891–9, 2007.
- UHITIL, S.; JAKSIC, S.; PETRAK, T.; MEDIC, H.; GUMHALTER-KAROLYI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 213-216, 2004.