

CARACTERIZAÇÃO DE VIRULÊNCIA EM *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE CARCAÇAS BOVINAS NO SUL DO BRASIL

MARIANA ALMEIDA IGLESIAS¹; ISABELA SCHNEID²; LOUISE HAUBERT³
MARCELO MENDONÇA⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – maryanaiglesias@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marcelomendoncavet@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram positiva, intracelular facultativa, responsável por causar a listeriose, uma doença de origem alimentar relativamente incomum, que pode evoluir para casos graves, como meningite, meningoencefalite ou septicemia, muitas vezes levando a morte em idosos, recém-nascidos ou pacientes imunocomprometidos (MCLAUCHLIN et al., 2004; LUBER et al., 2011).

A contaminação por este micro-organismo é de difícil controle, tendo em vista sua ampla disseminação e capacidade fisiológica de adaptação, as quais permitem seu desenvolvimento sob condições que geralmente são desfavoráveis a outras bactérias patogênicas (UHITIL et al., 2004). Assim sendo, esse patógeno tornou-se motivo de preocupação para a saúde pública, uma vez que é altamente virulento, principalmente em relação aos grupos de risco, podendo ser fatal em até 30% dos casos (CDC, 2005)

Sabe-se que a patogênese de *L. monocytogenes* é facilitada pela ação de um conjunto de genes de virulência, dentre os quais se destacam os genes que codificam as internalinas (MILOHANIC et al., 2003; DE LAS et al., 2011), que são proteínas de superfície cuja principal função é mediar a aderência e internalização da bactéria na célula hospedeira, principalmente em células não fagocíticas (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001), sendo indispensáveis para iniciar o ciclo da infecção. A pesquisa pela presença destes genes em isolados de *L. monocytogenes* é utilizada para caracterização do seu potencial de virulência bem como, por serem considerados genes espécie-específicos, são utilizados para a identificação e confirmação em nível de espécie.

Embora qualquer isolado de *L. monocytogenes* possa ser considerado potencialmente patogênico para humanos, vários estudos sugerem que este micro-organismo apresenta virulência heterogênea entre as cepas, o que torna essencial o conhecimento da expressão dos genes associados à virulência deste patógeno (INDRAWATTANA et al., 2011; GELBICO e KA PI KO, 2012).

No entanto, pouco ainda se sabe em relação à virulência de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos no Brasil. Desta maneira, objetivou-se verificar a presença dos genes *inIA*, *inIC* e *inIJ* e a expressão de *inIA* em *L. monocytogenes* isoladas em dois frigoríficos-matadouros do sul do Rio Grande do Sul- Brasil.

2. METODOLOGIA

Foram analisados doze isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de quatro pontos da linha de abate de bovinos (sangria, esfola, evisceração e lavagem antes do pré-resfriamento) de frigoríficos-matadouros do sul do Brasil.

A extração do DNA dos isolados foi realizada utilizando pérolas de vidro (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), após incubação em Tryptic Soy Broth – TSB (Acumedia®) a 35°C por 24 horas. Em seguida, o DNA bacteriano extraído foi quantificado através do equipamento NanoVue™ Plus e a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi realizada utilizando o termociclador MJ Research PTC 100.

Para caracterização molecular dos isolados de *L. monocytogenes* foram utilizadas sequências de oligonucleotídeos derivadas dos genes internalina A (*inIA*), internalina C (*inIC*) e internalina J (*inIJ*), com produtos de amplificação de 800pb, 517pb e 238pb respectivamente (LIU et al., 2007).

Para análise da expressão do gene *inIA*, o RNA foi extraído e purificado pelo RiboPure™-Bacteria Kit (Ambion®), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade do RNA foi verificada através da quantificação em NanoVue™ Plus. A síntese de cDNA foi realizada pelo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), de acordo com as instruções do fabricante. Após, realizou-se a técnica de RT-PCR (Transcriptase Reverse-PCR) utilizando-se *primer* descrito por LIU et al. (2007).

Os produtos gerados na PCR e RT-PCR foram submetidos a eletroforese a 80V por uma hora em gel de agarose 1,5%. O produto amplificado foi corado com GelRed™ e visualizado em transiluminador (Loccus®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que todos os isolados provenientes de carcaça bovina portavam os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ*, conforme Figura 1, indicando o potencial de virulência dos isolados de alimentos, uma vez que os produtos destes genes têm funções cruciais na patogenicidade de *L. monocytogenes*: *inIA* codifica a proteína InIA, necessária para a internalização nas células epiteliais intestinais (HAMON, BIERNE E COSSART, 2006); *inIC* codifica InIC, importante na difusão intracelular do patógeno; já *inIJ*, codifica a proteína InIJ, a qual, embora não tenha função definida, é um determinante de virulência importante (LIU et al., 2007), uma vez que é considerado gene conservado no genoma de *L. monocytogenes* e ausente nas demais espécies (DOUMITH et al., 2004)

Nossos resultados são semelhantes a estudos anteriores (LIU et al., 2007; INDRAWATTANA et al., 2011; GELBICOVA & KARPISKOVA, 2012, JAMALI et al., 2013), nos quais isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos carregavam os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ*, demonstrando o potencial de virulência desses isolados.

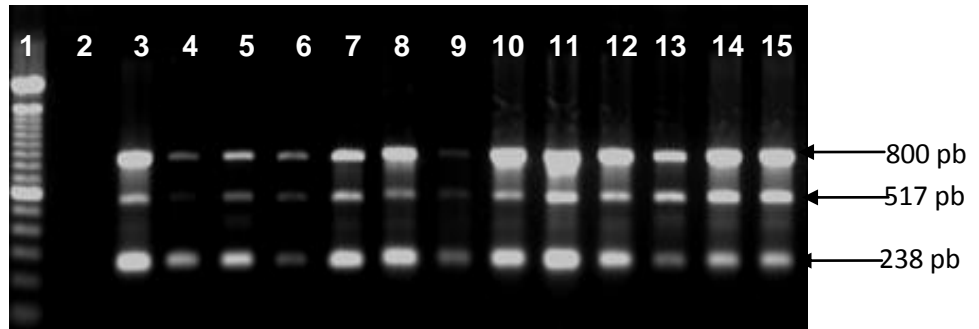


Figura 1 – Presença dos genes *inIA* (800 pb), *inIC* (517pb) e *inIJ* (238 pb) em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas. Coluna 1: marcador de peso molecular 100pb; Coluna 2: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, Coluna 3: *L. monocytogenes* ATCC 7644, Colunas 4 a 15: *L. monocytogenes* isoladas de carcaça bovina.

Embora os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas carregem todos os genes de virulência pesquisados, esse fato, por si só, não é suficiente para determinar sua virulência, haja vista que podem ocorrer alterações na transcrição e na tradução ou, ainda, após a tradução. Entretanto, pode-se inferir que estes isolados possuem potencial para causar a doença, sendo necessários outros experimentos para confirmar a sua virulência.

Por este motivo realizou-se a técnica de RT-PCR, para avaliação da expressão do gene da internalina A. Os resultados da RT-PCR demonstraram que todos os isolados expressaram o gene *inIA* (Figura 2), o que sugere que os isolados possuem potencial de virulência, uma vez que a expressão deste gene é de grande importância para que a bactéria tenha a capacidade de aderir a célula hospedeira e, então, iniciar o ciclo da infecção.

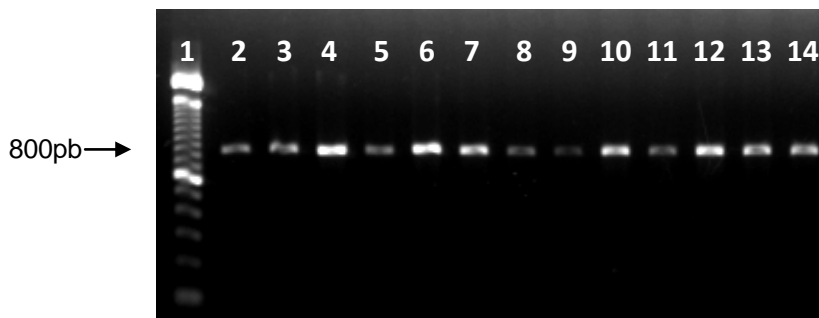


Figura 2- Expressão do gene *inIA* (800 pb) em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas. Coluna 1: marcador de peso molecular 100pb. Coluna 2 a 13: *L. monocytogenes* isoladas de carcaça bovina. Coluna 14: *L. monocytogenes* ATCC 7644.

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de quatro pontos da linha de abate de bovinos de frigoríficos-matadouros do sul do Brasil analisados neste estudo carregam os genes *inIA*, *inIC* e *inIJ*, e todos expressam o gene *inIA*, o que caracteriza um risco potencial, uma vez que a presença e expressão destes genes está diretamente relacionado à patogenicidade dos isolados. Porém, para que se possa confirmar esse potencial de virulência são necessárias análises complementares,

como o sequenciamento do DNA e ensaio *in vitro* de invasão em células de mamíferos, as quais estão sendo conduzidas por nosso grupo de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- LUBER, P., CRERAR, S., DUFOUR, C., FARBER, J., DATTA, A., & TODD, E. C. D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization — Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v.22:9, p.1535–1549, 2011.
- MCLAUCHIN, J., HALL, S., VELANI, S., GILBERT, R. Human listeriosis and paté: a possible association, *British Medical Journal*, v.303, p.773,1996.
- MILOHANIC, E., P. GLASER, J.-Y. COPPE'E, L. FRANGEUL, Y. VEGA, J. A. VÁZQUEZ- BOLAND, F. KUNST, P. COSSART, AND C. BUCHRIESER. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. **Molecular Microbiology**. v. 47, p.1613–1625, 2003.
- SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. W. **Molecular cloning**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001..
- UHITIL, S.; PETRAK, T.; MEDIC, H.; GUMHALTER-KAROLUI, L. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. **Food Control**,v. 15, n. 3, p. 213-216, 2004.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J, KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinic and Microbiology Reviews**, v. 14, n. 3, p. 584– 640. 2001.
- LIU D., LAWRENCE M.L., AUSTIN F.W., AINSWORTH A.J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, v.71, p.133-140, 2007.
- INDRAWATTANA N., NIBADDHASOBON T., SOOKRUNG N., CHONGSA-NGUAN M., TUNGTRONGCHITR A., MAKINO S., TUNGYONG W., CHAICUMPA W. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods. **Journal of Health Population and Nutrition**, v.29, p. 26-38, 2011.
- CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary Foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through-food – 10 States, United States, 2005.
- DE LAS, H. A.; CAIN, R. J.; BIELECKA, M. K.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. **Curr.Opin.Microbiol.**, v.14, n.2, p.118-127, 2011.
- GELBICO T., KAPIKO . Outdoor Environment as a Source of *Listeria monocytogenes* in Food Chain. **Journal of Food Sciences**, v.30, p.83-88, 2012.
- COSSART P., TOLEDO-ARANA, A.. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, Paris, v.10, p.1041-1050, 2006.
- DOUMITH M., CAZALET., SIMOES N., FRANGEUT C., KUNST F., MARTIN P., COSSART P., BUCHTIESER C. Nem aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection Immune**, v 72, p 1072-1083, 2004.
- JAMALI , H., RADMEHR , B. THONG, K. Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. **Food Control**, v.34. p.121-125, 2013.