

DETECÇÃO RÁPIDA DE *Listeria monocytogenes* EM AMOSTRA DE QUEIJO MINAS FRESCAL POR WESTERN BLOT

STEFANI NATALI STOLL¹; MARCELO MENDONÇA²; RAFAEL LOPES DA ROSA²;
GUSTAVO SCHMIDT GARCIA MOREIRA²; ÂNGELA NUNES MOREIRA²;
FABRÍCIO ROCHEDO CONCEIÇÃO³

¹Laboratório de Imunologia Aplicada - Biotecnologia - CDTec - UFPEL - stefani.stoll@gmail.com

²Laboratório de Imunologia Aplicada - Biotecnologia - CDTec - UFPEL -

marcelomendoncavet@yahoo.com.br; rafaelbiotec@gmail.com;

moreira.gmsg@gmail.com; angelanm@ufpel.edu.br

³PPGB - UFPEL - fabricio.rochedo@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é o patógeno causador da doença alimentar denominada listeriose (GRAVES et al., 2010). Esta doença apresenta elevado grau de severidade, com índices de mortalidade variando de 20 a 30% (CDC, 2011), acometendo populações de risco como pacientes imunocomprometidos, gestantes, crianças e idosos. Atualmente quinze espécies do gênero *Listeria* são conhecidas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* (GRAVES et al., 2010), *L. fleischmannii* (BERSTCH et al., 2013), *L. weihenstephanensis* (HALTER et al., 2013); e outras cinco novas espécies documentadas no ano de 2014 (BAKKER et al., 2014). Dentre essas, apenas *L. monocytogenes* é patogênica para humanos e animais, e *L. ivanovii*, apenas para animais (GRAVES et al., 2010). O gênero *Listeria* é considerado ubíquo, sendo encontrado em alimentos como leite e seus derivados, mas também em produtos cárneos, peixes e frutos do mar. Por estes motivos, tal micro-organismo causa preocupação na indústria alimentícia e nos órgãos de saúde pública (CDC, 2011).

O método tradicional para detecção deste patógeno em alimentos e amostras de ambiente é realizado com diferentes meios de enriquecimento seletivos e testes bioquímicos, os quais tornam o processo oneroso e laborioso, podendo levar mais de 7 dias para obter o resultado final (GASANOV et al., 2005). Em vista disso, a busca de métodos de detecção mais rápidos e práticos é de interesse. Imunoensaios baseados em anticorpos monoclonais (MAbs) usados para a detecção rápida desta bactéria têm como vantagem a alta especificidade, reprodutibilidade e seletividade. Os MAbs contra *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, utilizados neste estudo, foram produzidos previamente no Laboratório de Imunologia Aplicada - Biotecnologia - UFPEL, sendo um MAb específico contra a proteína internalina A (InIA), presente em espécies patogênicas, e outro que reconhece uma proteína de 30 kDa, presente no gênero *Listeria*.

No Brasil, a legislação vigente estabelecida pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) preconiza a avaliação de *L. monocytogenes* em queijos de média, alta e muito alta umidade (BRASIL, 2001). Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a rápida detecção de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal, através da técnica de *Western blot*, utilizando MAbs contra *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*.

2. METODOLOGIA

Cepas, cultivo e contaminação artificial

Cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19114 e *L. innocua* foram cultivadas em 5 mL de caldo de TSB-YE (Caldo Triptona de Soja suplementado com 0,6% de Extrato de Levedura), e incubadas por 18 h a 37 °C. Ambas cepas foram inoculadas (aproximadamente 2 UFC/g), de maneira estéril, em 10 g de queijo tipo Minas Frescal e incubado por 15 min a 25 °C para favorecer a aderência da bactéria na matriz do alimento. As amostras foram colocadas em sacos tipo *stomacher*, juntamente com 90 mL de meio Fraser em cada saco, os quais foram agitados por 2 min e incubados a 37 °C por 18 h. Amostras de queijo não-inoculados serviram de controle negativo. Após, 10 mL de cada cultura enriquecida obtida dos sacos foram coletados cuidadosamente, evitando retirar partes do alimento, e transferidas para tubos de 15 mL, lavados por duas vezes com PBS-T e suspensos em 10 mL de PBS.

Western blot para detecção e diferenciação de *Listeria*

Para realizar a eletroforese em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) e *Western blot*, os 10 mL de suspensão de bactérias do passo anterior foram recuperados por centrifugação, e ao final ressuspendidos em 1 mL de PBS e, então, passado para um tubo de microcentrifuga. Após nova centrifugação, o volume de 1 mL foi concentrado em 100 µL do tampão *sample solvent 2X* (4.6% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0,124 M Tris, 20% glicerol; pH 6.9), sonificado por 3 vezes de 10 s e aquecido por 10 min a 95 °C. As amostras foram submetidas à SDS-PAGE 12% e transferidas por 1 h a 100 V para uma membrana de PVDF. Após bloqueio com 5% de leite em pó, os MAbs marcados com peroxidase (STOLL et al., 2012), MAb-3B7 (~1 mg/mL, 1:1.000) e MAb-3F8 anti-*Listeria* spp. (~0,6 mg/mL, 1:1.000) foram adicionados, concomitantemente, à membrana e deixados sob agitação por 1 h a temperatura ambiente. Após, foi realizado lavagens com PBS-T e a reação foi revelada através da solução cromógena DAB (3,3'-diaminobenzidina). Amostras puras de *L. monocytogenes* e *L. innocua* cultivadas em caldo Fraser serviram de controle positivo no ensaio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A natureza ubíqua de *Listeria* spp. faz com que seja quase impossível sua eliminação do ambiente de plantas de processamento de alimentos (CARPENTIER, CERF, 2011). Uma vez que espécies não patogênicas e patogênicas podem ser encontradas na indústria ou em alimentos, é importante haver métodos de distinção de ambas. Assim, o anticorpo Anti-p30 de *Listeria* spp. (MAb-3F8) obtido pelo nosso grupo, torna-se uma importante ferramenta para a detecção rápida desse gênero bacteriano. Além disso, utilizando-se o anticorpo anti-InIA (MAb-3B7), a detecção de *L. monocytogenes* ou *L. ivanovii* é confiável e precisa, uma vez que essa proteína é somente encontrada em espécies patogênicas (MENDONÇA et al., 2012).

No nosso ensaio de detecção rápida de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em queijo Minas Frescal, utilizamos a técnica de *Western blot* com os dois MAbs (anti-InIA e anti-p30) para realizar a detecção de *Listeria* spp. patogênicas e não patogênicas. Com isso, ao visualizar duas bandas, uma correspondendo a 88 kDa da proteína InIA e outra de aproximadamente 30 kDa para a proteína p30, pode-se ter a certeza que é *L. monocytogenes*. Quando visualizado somente uma banda de

30 kDa, podemos afirmar que se trata de uma espécie não patogênica, no caso, *L. innocua* (Figura 1B). Deste modo, conseguimos diferenciar cepas patogênicas de não-patogênicas com mais rapidez, usando menos insumos e mão-de-obra em comparação ao requerido pela técnica convencional de isolamento deste micro-organismo.

Primeiramente, através de SDS-PAGE foi possível observar o padrão proteico das cepas de *Listeria*, após a inoculação artificial no queijo e cultivo em caldo Fraser (Figura 1A). Ao realizar a técnica de *Western blot*, pode-se observar o padrão de reação esperado dos MAb's com as cepas utilizadas. Os anticorpos foram capazes de reconhecer seus alvos específicos: proteínas recombinantes InIA e p30, bem como nativas nas cepas de *Listeria* tanto das amostras proteicas extraídas do cultivo de queijo e dos controles (Figura 1B). O MAb anti-InIA foi capaz de distinguir a cepa patogênica *L. monocytogenes* ATCC 19114 da *L. innocua* (não-patogênica) (Figura 1B).

Além disso, podemos comprovar neste ensaio, a eficácia dos MAb's marcados com peroxidase (STOLL et al., 2012). Sendo então, apenas necessária a etapa do anticorpo primário (sem necessidade do secundário), o que reduz em 1 h o tempo total do teste até o resultado definitivo. Ao todo, foram necessárias 26 h para o diagnóstico final, comparados com os 7 dias da técnica convencional (GASANOV et al, 2005).

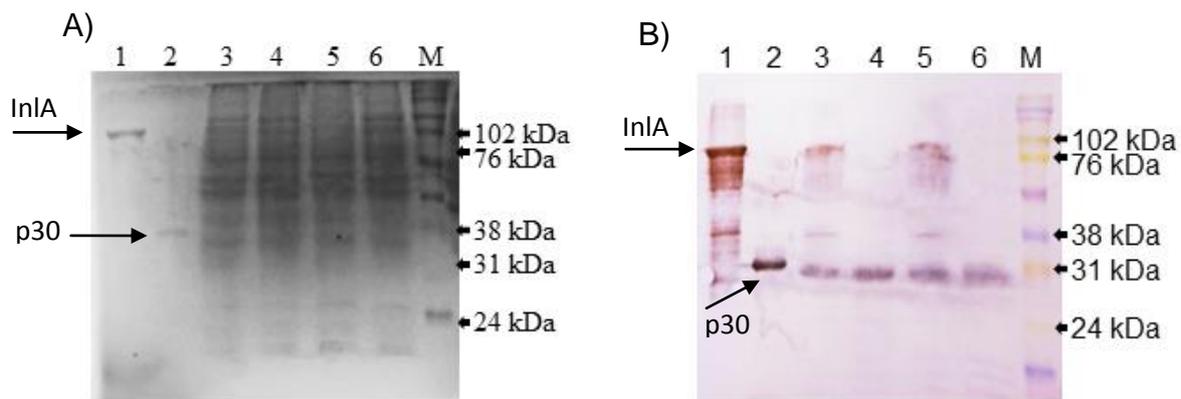


Fig. 1 – A) SDS-PAGE 12% do extrato de proteínas de extrato das bactérias inoculadas artificialmente em queijo Minas Frescal; B) *Western blot* utilizando MAb's-3B7 (Anti-InIA) e MAb-3F8 (Anti-p30) marcados com peroxidase e revelado por DAB. 1- rInIA (recombinante); 2- p30 (recombinante); 3- *L. monocytogenes* (queijo); 4- *L. innocua* (queijo); 5- *L. monocytogenes* (extrato controle); 6- *L. innocua* (extrato controle); M- Marcador pré-corado *Full-range Amersham Rainbow Marker* (GE Healthcare);

4. CONCLUSÕES

Foi possível detectar e diferenciar *L. monocytogenes* e *L. innocua* em amostras de queijo Minas Frescal artificialmente inoculado, utilizando a técnica de *Western blot* com os MAb's produzidos *in house* e conjugados com peroxidase. Desta forma, a técnica de *Western blot* utilizando os MAb's anti-InIA e MAb anti-p30 de *Listeria* spp. apresenta potencial para utilização na rápida confirmação de *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. a partir de amostras de alimentos ou ambientais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTSCH, D., RAU, J., EUGSTER, M.R., HAUG, M.C., LAWSON, P.A., LACROIX, C., MEILE L., *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. **Int J Syst Evol Microbiol.**, 63, 526–532, 2013.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC n. 12. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 janeiro 2001.

CARPENTIER, B., CERF, O., Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. **International Journal of Food Microbiology** 145, 1-8, 2011.

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

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

GASANOV, U., HUGHES, D., & HANSBRO, P. M. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. **FEMS Microbiol. Rev.**, 29, 851–875, 2005.

GRAVES, L.M., HELSEL, L.O., STEIGERWALT, A.G., MOREY, R.E., DANESHVAR, M.I., ROOF, S.E., ORSI, R.H., FORTES, E.D., MILILLO, S.R., den BAKKER, H.C., WIEDMANN, M., SWAMINATHAN, B., SAUDERS, B.D. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest, 60, 6, 1280-1288, 2010.

HALTER, L.A., NEUHAUS, K., SCHERER, S., *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. **Int J Syst Evol Microbiol**, 63. 641-647, 2013.

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

STOLL, S.N., MOREIRA, G.M.S.G., MENDONÇA, M., CONRAD, N.L., MOREIRA, A.N., CONCEIÇÃO, F.R., ALEIXO, J.A.G., Avaliação de Anticorpos Monoclonais Marcados com Peroxidase para Desenvolvimento de Teste de Detecção de *Listeria monocytogenes* e *Listeria* spp. em Alimentos. **VI Simpósio de Micro Aplicada e II Encontro Latino Americano de Microbiologia Aplicada**. Porto Alegre- RS, 2012.