

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* DE ORIGEM ALIMENTAR

DIEGO PERES ÁVILA¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; LAÍS ABREU ANASTÁCIO³; LUIZ GUSTAVO BACH⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵; GRACIELA VÖLZ LOPES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com

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

⁶Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbio facultativo, resistente ao ambiente e agente etiológico da listeriose em humanos (BOUYMAJANE et al., 2021; CDC, 2021). Listeriose é uma doença transmitida por alimentos (DTA), que, apesar de rara, possui uma alta taxa de letalidade, entre 20 a 30%, acometendo principalmente gestantes, idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos (OMS, 2018). Sua ocorrência transcorre na forma de surtos e/ou casos esporádicos, sendo septicemia, meningite, febre e diarreia manifestações clínicas comumente observadas (GUERRERO et al., 2012). Terapias antimicrobianas são recomendadas em casos de sintomatologia clínica e, geralmente, envolvem a utilização somente de beta-lactâmicos, como ampicilina, ou associados a outros fármacos, tais quais como gentamicina, meropenem e trimetoprima-sulfametoxazol (GUERRERO et al., 2012; TAI et al., 2020).

Apesar da comum suscetibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* a esses antimicrobianos, diferentes estudos têm relatado perfis de resistência e multirresistência a diversos antimicrobianos, principalmente em isolados de origem alimentar (BOUYMAJANE et al., 2021). O uso massivo de antimicrobianos gera uma pressão seletiva para o surgimento de bactérias resistentes. A resistência adquirida pode ocorrer através da aquisição de genes de resistência, os quais estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis, e podem ser facilmente transferidos entre isolados de *L. monocytogenes* e outras bactérias (HAUBERT et al., 2018; OMS, 2020). Diante do exposto, o objetivo do estudo foi determinar o perfil de resistência fenotípica de 82 isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de alimentos e ambientes de processamento de alimentos frente a 16 antimicrobianos e detectar genes de resistência através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

2. METODOLOGIA

MICRO-ORGANISMOS

Foram utilizados 82 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças de ovinos (n=6), queijo minas artesanal (n=5), salsicha mista fresca (n=6), carcaças de frango (n=6), carcaças bovinas (n=14), linha de embutidos frescos (n=5), matadouro de frango (n=16), planta de processamento de carne (n= 4), *beef jerky* (n=2), linha de processamento de *beef jerky* (n=4), queijo fatiado (n=2) e presunto fatiado (n=12) previamente identificados e pertencentes à bacterioteca do

Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPEl).

TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Os isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos ao teste de disco difusão em ágar de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). Os seguintes discos de antimicrobianos foram utilizados: amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), estreptomina (10 µg), sulfametoxazol+trimetoprima (23,75 µg+1,25 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg) (Laborclin, Brazil). Multirresistência foi definida como resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos.

DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

A investigação de genes de resistência foi realizada para aqueles isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram perfil fenotípico de resistência no teste de disco difusão em ágar. Os genes que codificam resistência a macrolídeos (*ereB*, *ermB* e *ermC*), aminoglicosídeos (*strA* e *strB*), tetraciclina (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* e *Tn916-1545*) e sulfonamidas (*sul1* and *sul2*) foram investigados através da técnica de PCR. Os primers utilizados foram descritos em estudos prévios (KEHRENBURG & SCHWARZ, 2001; HAUBERT et al., 2015).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *L. monocytogenes* demonstraram resistência a clindamicina (48,78%), meropenem (29,2%), sulfametoxazol + trimetoprima (29,2%) rifampicina (14,6%), eritromicina (10,9%), tetraciclina (8,5%), estreptomina (7,3%) e a amicacina (4,8%). A resistência à cefoxitina e ao ácido nalidíxico, por se tratar de resistência intrínseca, foi observada em todos os 82 isolados. Resistência a um ou mais antimicrobianos foi observada em 63,42% dos isolados (n=52) e resistência a múltiplas drogas foi observada em 18% dos isolados de *L. monocytogenes* (n=15), como demonstrado na **Tabela 1**. Quanto a análise molecular, foi possível detectar genes de resistência em 7,32% (n=6) dos 82 isolados, sendo eles *tet(L)* e *tet(M)*, genes responsáveis por codificar resistência a tetraciclina. Os genes que codificam resistência a macrolídeos (*ereB*, *ermB* e *ermC*), aminoglicosídeos (*strA* e *strB*) e sulfonamidas (*sul1* and *sul2*) não foram detectados, bem como os genes de resistência a tetraciclina, *tet(K)*, *tet(O)*, e o transposon *Tn916-1545*.

Ainda que os isolados de *L. monocytogenes* não tenham demonstrado resistência a alguns antimicrobianos utilizados para tratamento da listeriose em humanos, como ampicilina e gentamicina, observa-se a ocorrência de isolados multirresistentes (18%). Resultado inferior ao que foi obtido no estudo de Tahoun et al. (2017), no qual os autores obtiveram 88% (n=37) dos seus isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar apresentando perfis de multirresistência. Ademais, Maung et al. (2019), através de seu estudo comparativo entre isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar de 2012 e 2017, relataram que em 2012, 46,67% (n=35) dos isolados apresentaram multirresistência, enquanto que em 2017 esse perfil foi apresentado por mais de 80% (n=19) dos isolados.

Quanto aos genes de resistência, Filipello et al. (2020) identificaram o gene *tet(M)* em 5,3% (n=27) dos isolados de *L. monocytogenes* de origem clínica e

alimentar. Ainda, os autores foram capazes de detectar um isolado carregando o gene *tet(K)*. A detecção do gene *tet(M)* também foi relatada por Haubert et al. (2016) em isolados multirresistentes de *L. monocytogenes* de origem alimentar. O principal genótipo para resistência à tetraciclina encontrado em *Listeria* spp. é o gene *tet(M)*, um gene de proteção ribossômica encontrado com mais frequência no cromossomo (WANG et al., 2013). Em contrapartida, há poucos relatos na literatura sobre a identificação do gene *tet(L)* em isolados de *Listeria* spp., o qual é codificado por uma bomba de efluxo presente em um plasmídeo, e foi observado em seis isolados resistentes a tetraciclina (7,32%) no presente estudo.

Tabela 1. Perfis de resistência a antimicrobianos entre 82 isolados de *Listeria monocytogenes* de origem alimentar

Identificação	Perfil fenotípico de resistência	Número de isolados (%)	Genes de resistência
P1*	Suscetível	30 (36,6)	
P2	CLI	28 (34,1)	
P3	MER-SUT	9 (11,0)	
P4	AMI-MER-SUT	3 (3,6)	
P5	EST-CLI-RIF-MER-SUT	3 (3,6)	
P6	CLI-ERI-MER-RIF-SUT-TET	5 (6,1)	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
P7	EST-ERI-CLI-RIF-MER-SUT	2 (2,4)	
P8	AMI-CLI-ERI-MER-RIF-SUT-TET	1 (1,2)	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
P9	EST-ERI-CLI-RIF-MER-SUT-TET	1 (1,2)	

AMI: amicacina, CLI: clindamicina, EST: estreptomicina, ERI: eritromicina, MER: meropenem, RIF: rifampicina, SUT: sulfametoxazol + trimetoprima, TET: tetraciclina.

* Perfis fenotípicos

4. CONCLUSÕES

A identificação de isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar apresentando perfis de resistência e multirresistência, assim como a detecção de genes de resistência, representam um potencial risco à saúde do consumidor e à eficácia de possíveis tratamentos antimicrobianos. Portanto, torna-se necessário o investimento em pesquisas relacionadas à detecção e transferência desses genes a outras bactérias de importância.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOUYMAJANE, A.; FILALI, F. R.; OULGHAZI, S.; LAFKIH, N.; ED-DRA, A.; ABOULKACEM, A.; ALLAOUI, A. E.; OUHMIDOU, B.; MOUMNI, M. Occurrence, antimicrobial, serotyping and virulence genes of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **Heliyon**, v.7, e06169, 2021.

CDC. **Listeria (Listeriosis)**. For Health Professionals, 30 mar. 2021. Acessado em 20 jul. 2021. Online. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/technical.html>

- FILIPELLO, V.; MUGHINI-GRAS, L.; GALLINA, S.; VITALE, N.; MANNELLI, A.; PONTELLO, M.; DECASTELLI, L.; ALLARD, M.W.; BROWN, E.W.; LOMONACO, S. Attribution of *Listeria monocytogenes* human infections to food and animal sources in Northern Italy. **Food Microbiology**, v.89, 103433, 2020.
- GUERRERO, M.L.F.; TORRES, R.; MANCEBO, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.J.; GÓRGOLAS, M.; JUSDADO, J.J.; ROBLAS, R.F. Antimicrobial treatment of invasive non-perinatal human listeriosis and the impact of the underlying disease on prognosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, p.690-695, 2012.
- HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G. V.; DE ITAPEMA CARDOSO, M. R.; DA SILVA, W. P. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, n.1, p.23-29, 2016.
- HAUBERT, L.; CRUXEN, C.E.S.; FIORENTINI, A.M.; DA SILVA, W.P. Tetracycline resistance transfer from foodborne *Listeria monocytogenes* to *Enterococcus faecalis* in Minas Frescal cheese. **International Dairy Journal**, v.87, p.11-15, 2018.
- KEHRENBURG, C.; SCHWARZ, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 205, p.283-290, 2001.
- MAUNG, A.T.; MOHAMMADI, T.N.; NAKASHIMA, S.; LIU, P.; MASUDA, Y.; HONJOH, K.; MIYAMOTO, T. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan. **International Journal of Food Microbiology**, v.304, p.49-57, 2019.
- OMS. **Listeriosis**. Newsroom, 20 fev. 2018. Acessado em 20 jul. 2021. Online. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/listeriosis>
- OMS. **Antimicrobial resistance**. Newsroom, 13 out. 2020. Acessado em 20 jul. 2021. Online. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- TAHOUN, A.B.M.B.; ELEZ, R.M.M.A.; ABDEL FATAH, E.N.; ELSOHABY, I.; ELGEDAWY, A.A.; ELMOSLEMANY, A.M. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.10, p.264-270, 2017.
- TAI, Y.L.; CHI, H.; CHIU, N.C.; LIN, C.Y.; CHENG, J.L.; HSU, C.H.; CHANG, J.H.; HUANG, D.T.N.; HUANG, C.Y.; HUANG, F.Y. Clinical features of neonatal listeriosis in Taiwan: A hospital-based study. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.53, p.866-874, 2020.
- WANG, X.M.; LU, X.F.; YIN, L.; LIU, H.F.; ZHANG, W.J., SI, W.; YU, S.Y.; SHAO, M.L. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, v.32, p.153-158, 2013.