

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE ALIMENTOS E AMBIENTES DE PROCESSAMENTO

LOUISE HAUBERT¹; MAIARA LINDEMANN ZEHETMEYR²; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS³; CARLA POHL SEHN⁴; MARCELO MENDONÇA⁵; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas- UFPel – lousehaubert@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas- UFPel – maiara.lz@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- UFPel – maryanaiglesias@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- UFPel – carla.pohlsehn@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas- UFPel – marcelomendoncavet@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas- UFPel – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e amplamente distribuída no meio ambiente (BERTSCH et al., 2014). Este micro-organismo é um patógeno de origem alimentar, responsável por causar listeriose, uma doença que acomete tanto humanos como animais, podendo causar meningite, septicemia, encefalomielite e casos fatais em humanos, especialmente em idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos e imunocomprometidos (DUSSURGET et al., 2004).

Considerando a alta letalidade relacionada a essa doença, a antibioticoterapia é necessária para o tratamento dos sintomas clínicos. Em geral, isolados de *L. monocytogenes* são sensíveis aos antibióticos de escolha para o tratamento de listeriose, como β -lactâmicos e aminoglicosídeos (ALONSO-HERNANDO et al., 2012). Entretanto, alguns isolados vêm apresentando perfil de resistência e, até mesmo, de multirresistência, o que pode afetar o tratamento da doença, bem como aumentar a dispersão de resistência aos antimicrobianos entre bactérias (MARIAN et al., 2012; SHI et al., 2015; WANG et al., 2013, 2015).

O surgimento de tais cepas resistentes destaca a necessidade de programas de vigilância para monitorar mudanças temporais e geográficas nos padrões de resistência, visto que podem atuar como reservatórios de resistência por se tratarem de bactérias ubíquas (BERTSCH et al., 2014). No entanto, haja vista que os padrões para avaliação dos perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos de *L. monocytogenes* ainda são escassos, a identificação do genótipo de resistência deve ser utilizada em conjunto, pois confere uma maior clareza na identificação destes perfis. Além disso, a maioria dos genes de resistência está associada a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, que também devem ser avaliados para a caracterização dos perfis de resistência (BERTRAND et al., 2005; SAFDAR; ARMSTRONG, 2003).

Há pouca informação disponível sobre resistência a antimicrobianos em *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de produção no Brasil, e pouco ainda se sabe em relação à caracterização molecular de isolados com perfil de multirresistência. Dessa forma, o presente trabalho objetivou realizar a caracterização molecular da resistência aos antimicrobianos de isolados de *L. monocytogenes* oriundos de alimentos e de ambientes de processamento do sul do Rio Grande do Sul com perfil fenotípico de multirresistência.

2. METODOLOGIA

Cinco isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de processamento de Pelotas, RS, com perfil fenotípico de multirresistência, foram avaliados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), visando a detecção dos genes de resistência para a classe das tetraciclinas: *tetA* (953pb), *tetB* (1169pb) (FRECH; SCHWARZ, 2000), *tetK* (360pb), *tetM* (158pb) (STROMMINGER et al., 2003), *tetL* (1028pb) (PANG et al., 1994), *tetO* (781pb), Tn916-1545 (1028pb) (LI et al., 2007) e para a classe dos macrolídeos: *ereB* (546pb) (SUTCLIFFE et al., 1996), *ermB* (424pb) (JENSEN et al., 1999) e *ermC* (299pb) (STROMMINGER et al., 2003).

Foi realizada extração de DNA genômico dos isolados, de acordo com o protocolo proposto por GREEN; SAMBROOK (2012), com adaptações. O DNA foi quantificado por espectrofotometria, utilizando-se o Eppendorf BioSpectrometer kinetic® (Eppendorf). Além disso, os isolados foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o Kit NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

Após a quantificação do DNA cromossomal e plasmidial, as amostras foram submetidas 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), 10 pmol para os *primers forward* e *reverse*, 10 ng de DNA e água ultrapura para um volume final de 25 µL.

As condições de amplificação para os genes avaliados seguiram os protocolos descritos pelos autores e os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados em transiluminador (Loccus®).

Os produtos obtidos pela PCR foram purificados e sequenciados para validar suas identidades. O sequenciamento das amostras foi realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar da suscetibilidade do patógeno frente a vários antimicrobianos, alguns isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos vem apresentando perfil de multirresistência, o que se deve principalmente, ao uso indiscriminado e/ou errôneo dos agentes antimicrobianos (ALONSO-HERNANDO et al., 2012; BERTSCH et al., 2014; MARIAN et al., 2012; WANG et al., 2015).

Na Tabela 1 podemos observar as características dos isolados multirresistentes. No presente estudo, o isolado 16 de *L. monocytogenes*, oriundo de linguiça mista frescal, carrega o gene *tetM*, tanto no DNA cromossomal como no DNA plasmidial. Além disso, o isolado 46, oriundo de abatedouro de aves, carrega o gene *ermB*, e apesar da presença de plasmídeo no isolado, o gene de resistência para esse macrolídeo somente foi identificado no DNA cromossomal.

Tabela 1 - Características dos isolados multirresistentes avaliados

Isolados	Origem	Ano de isolamento	Genótipo de resistência	DNA plasmidial contendo gene de resistência
13	Linguiça mista frescal	2003	-	-
14	Linguiça mista frescal	2003	-	-
16	Linguiça mista frescal	2003	<i>tetM</i>	sim

30	Planta de processamento de linguiça mista frescal	2003	-	-
46	Abatedouro de aves	2006	<i>ermB</i>	-

De acordo com CHARPENTIER et al. (1995), o gene *tetM* é o mais encontrado no cromossomo de espécies de *Listeria* resistentes à tetraciclina, e pode estar relacionado com a presença de transposons conjugativos, como Tn916-1545. No presente estudo, não observou-se a presença do transposon Tn916-1545, porém, o gene de resistência *tetM* foi identificado, tanto no DNA cromossomal como no plasmidial, sugerindo a possibilidade de ocorrer a transferência horizontal para outras bactérias, através de eventos de conjugação (BERTSCH et al., 2014; ROBERTS, 2005).

SRINIVASAN et al. (2005) não identificaram nenhum gene de resistência para os macrolídeos (*ereB*, *ermB* e *ermC*) entre isolados de *L. monocytogenes* com resistência fenotípica para a eritromicina. Os genes *erm* codificam enzimas metilases no RNA ribossômico, os quais alteram o sítio de ligação 23S do ribossomo bacteriano. A presença do gene *ermB* em isolados avaliados no presente estudo indica a possibilidade de transferência para outras espécies de *Listeria*, bem como para outras bactérias, como *E. faecalis* (ROBERTS, 2005).

4. CONCLUSÕES

Listeria monocytogenes isoladas de alimentos e ambientes de processamento, apresentando perfil de multirresistência aos antimicrobianos, carregam genes de resistência. Isolados multirresistentes podem servir como reservatórios de genes de resistência e, considerando a presença de elementos genéticos móveis como plasmídeos contendo estes genes, são necessários maiores estudos para investigar a capacidade de transferência horizontal de genes de resistência para outras bactérias patogênicas e/ou comensais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO-HERNANDO, A.; PRIETO, M.; GÁRCIA-FERNÁNDEZ, C.; ALONSO-CALLEJA, C.; CAPITA, R. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. **Food Control**, v. 23, p. 37-41, 2012.
- BERTRAND, S.; HUYS, G.; YDE, M.; D'HAENE, K.; TARDY, F.; VRINTS, M.; SWINGS, J.; COLLARD, J.M. Detection and characterization of *tet(M)* in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 1151-1156, 2005.
- 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, 2014.
- CHARPENTIER, E.; GERBAUD, G.; JACQUET, C.; ROCOURT, J.; COURVALIN, P. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 277-281, 1995.

- DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, p. 587-610, 2004.
- FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 633-641, 2000.
- GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012. 4 edição.
- JENSEN, L. B.; MÖLLER, N. F.; AARESTRUP, F. M. Presence of *erm* gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 151-158, 1999.
- 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.
- MARIAN, M. N.; SHARIFAH-AMINAH, S.M.; ZURAINI, M.I.; SON, R.; MAIMUNAH, M.; LEE, H.Y. MPN-PCR detection and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods in Malaysia. **Food Control**, v. 28, p. 309-314, 2012.
- PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polymerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 417-422, 1994.
- ROBERTS, M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 195-203, 2005.
- SAFDAR, A.; ARMSTRONG, D. Antimicrobial activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systematic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 483-485, 2003.
- SHI, W.; QINGPING, W.; JUMEI, Z.; MOUTONG, C.; ZEAN, Y. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. **Food Control**, v. 47, p. 340-347, 2015.
- SRINIVASAN, V.; NAM, H.M.; NGUYEN, L.T.; TAMILSELVAM, B.; MURINDA, S.E.; OLIVER, S.P. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, p. 201-211, 2005.
- STROMMINGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4089-4094, 2003.
- SUTCLIFFE, J.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but susceptible to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1817-1824, 1996.
- WANG, X.M.; LU, X.F.; YIN, L.; LIU, H.F.; ZHANG, W.J.; SI, W.; YU, S.Y.; SHAO, M.L.; LIU, S.G. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. **Food Control**, v. 32, p. 153-158, 2013.
- WANG, G.; QIAN, W.; ZHANG, X.; WANG, H.; YE, K.; BAI, Y.; ZHOU, G. Prevalence, genetic diversity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat meat products in Nanjing, China. **Food Control**, v. 50, p. 202-208, 2015.