

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA À TETRACICLINA EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes*

ITIANE BARCELLOS JASKULSKI¹; LETICIA KLEIN SCHEIK²; PAMELA
INCHAUSPE CORREA ALVES³; ISABELA SCHNEID KRÖNING⁴; LOUISE
HAUBERT⁵; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – leticiascheik@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno de origem alimentar, sendo o agente causador da listeriose, uma infecção que pode ocorrer em humanos (HAMIDIYAN et al., 2018). Possui característica ubíquitária, podendo ser isolada de diversas etapas da cadeia produtiva de alimentos e também de alimentos prontos para o consumo (DEN BAKKER et al., 2013). Embora apresente baixa ocorrência, a listeriose tem alta taxa de letalidade, em torno de 30% (FAO/WHO, 2004) e se caracteriza pela invasão do sistema nervoso central ou placentário causando sintomas como aborto, encefalite, meningite e sepse em pessoas que compõe o grupo de risco (imunocomprometidos, gestantes, idosos e recém-nascidos) (SCHUCHAT et al., 1991; CHARLIER et al., 2017).

Sabe-se que os isolados de *L. monocytogenes* geralmente são suscetíveis à maioria dos antimicrobianos, entretanto, algumas estirpes têm apresentado perfil de resistência (ALONSO-HERNANDO et al., 2012; BERTSCH et al., 2014). Apesar do surgimento de micro-organismos resistentes a antimicrobianos ser um fenômeno natural, o uso excessivo ou inadequado dessas substâncias tem contribuído para o aumento dessa resistência entre os micro-organismos (BURNHAM et al., 2017).

Dentre as classes de antimicrobianos em que o fenótipo e genótipo de resistência foram identificados em isolados de *L. monocytogenes*, se destaca o surgimento de resistência às tetraciclinas. Embora não apresentem importância clínica para o tratamento de listeriose, estes genes de resistência podem ser transferidos para outras bactérias através de elementos genéticos móveis, o qual é o principal problema relacionado a estas resistências (BERTSCH et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi avaliar o perfil de resistência a tetraciclina em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de processamento de alimentos.

2. METODOLOGIA

Micro-organismos

Foram utilizados 20 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de *beef jerky* (n=2), linha de processamento de *beef jerky* (n=4) *sushi* (n=5), linha de processamento de frango (n=9), todos previamente caracterizados e pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPel).

Testes de susceptibilidade a tetraciclina

Foi utilizado o método de disco difusão em ágar, de acordo com as especificações do Comitê de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST 2017), avaliando-se o antimicrobiano tetraciclina, em concentração de 30 µg (Laborclin®). Os critérios de interpretação foram estabelecidos de acordo com os propostos pelo EUCAST (2017).

Técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os isolados que apresentaram fenótipo de resistência ao antimicrobiano tetraciclina foram submetidos à técnica de PCR para avaliação da presença de genes de resistência *tetL*, *tetO*, *tetK*, *tetM* e *Tn916-1545*. Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados no software Vector NTI®, a partir das sequências dos genes obtidos no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que dos 20 isolados de *L. monocytogenes* avaliados, 30% (n=6) apresentaram resistência fenotípica à tetraciclina, bem como carreiam os genes *tetM* e *tetL*, os quais estão intimamente relacionados à resistência a esse antimicrobiano.

Há relatos na literatura sobre o crescente número de estirpes de *L. monocytogenes* se tornando resistentes à maioria dos antimicrobianos de uso clínico, incluindo os utilizados no tratamento da listeriose. Isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes já foram identificados em alimentos e plantas de processamento de alimentos. Os níveis de resistência são variados e influenciados pelo uso de antimicrobianos em humanos e animais, além de diferenças geográficas (HAUBERT et al., 2015; ALLEN et al., 2016; ESCOLAR et al., 2017).

A resistência à tetraciclina na maioria das bactérias e a disseminação da resistência antimicrobiana são atribuídas à aquisição de novos genes, frequentemente associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos e/ou transposons conjugativos encontrados em vários gêneros bacterianos (ROBERTS, 2005 ; CHEN et al., 2010). O principal genótipo para resistência à tetraciclina encontrado em *Listeria* spp. é o gene *tetM*, 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 *tetL* em isolados de *Listeria* spp., o qual é codificado por uma bomba de efluxo presente em um plasmídeo, ressaltando a importância do resultado obtido no presente estudo.

HAUBERT et al. (2015) encontraram o gene *tetM* em isolados multirresistentes de *L. monocytogenes* de origem alimentar, resultado semelhante ao obtido neste estudo. Da mesma forma, JAMALI et al. (2015) identificaram o gene *tetM* em 25,6% dos isolados de origem alimentar. Entretanto, em nenhum daqueles estudos foi identificada a presença do gene *tetL*, diferentemente desse estudo, onde 30% dos isolados carreavam o gene *tetL*.

4. CONCLUSÕES

A identificação de isolados de *L. monocytogenes* que apresentam genes relacionados à resistência a tetraciclina em isolados de alimentos, sugere um risco potencial à saúde dos consumidores, além do risco de disseminação dos genes identificados para outras bactérias. Ressalta-se que a resistência a antimicrobianos em isolados de *L. monocytogenes* pode comprometer o tratamento da listeriose em humanos. Porém, são necessários mais estudos para investigar a possibilidade de transferência horizontal desses genes de resistência a outras bactérias comensais e patogênicas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K.J.; WAŁECKA-ZACHARSKA, E.; CHEN, J.C.; KATARZYNA, K.P.; DEVLIEGHERE, F.; VAN MEERVENNE, E.; OSEK, J.; WIECZOREK, K.; BANIA, J. *Listeria monocytogenes*—an examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v.54, p.178-189, 2016.

ALONSO-HERNANDO, A.; PRIETO, M.; GARCÍA-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, n.1, p.37-41, 2012.

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, n.1, p.118-127, 2014.

CHARLIER, C.; PERRODEAU, E.; LECLERCQ, A.; CAZENAVE, B.; PILMIS, B.; HENRY, B.; LOPES, A.; MAURY, M.; MOURA, A.; NET, F.G.. Clinical Features and Prognostic Factors of Listeriosis: The Monalisa national prospective cohort study. **Lancet Infectious Diseases**, v.17, p.510-519, 2017.

CHEN, B.Y.; PYLA, R.; KIM, T.J.; SILVA, J.L.; JUNG, Y.S. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.626– 632, 2010.

DEN BAKKER, H.C.; DESJARDINS, C.A.; GRIGGS, A.D.; PETERS, J.E.; ZENG, Q.; YOUNG, S.K.; BIRREN, B.W. Evolutionary dynamics of the accessory genome of *Listeria monocytogenes*. **PLoS One**, v.8, n.6, p.67511, 2013.

EUCAST European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility. Version 4.0. p. 1–24, 2017. Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Reading_guide_v_4.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.

ESCOLAR, C.; GÓMEZ, D.; DEL CARMEN ROTA GARCÍA, M.; CONCHELLO, P.; HERRERA, A. Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain. **Foodborne pathogens and disease**, v.14, n.6, p.357-363, 2017.

FAO/WHO Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: technical report. **Microbiol Risk Assess**, v.5, p.1– 34, 2004. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42875/1/9241562625.pdf?ua=1>

HAMIDIYAN, N.; SALEHI-ABARGOUEI, A.; REZAEI, Z.; TAFTI, R. D.; AKRAMI-MOHAJERI, F. The prevalence of *Listeria spp.* food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Food Research International**, v. 107, p. 437-450, 2018.

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, 2015.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; ISMAIL, S.; LOOI, C.Y.; WONG, W.F.; RADMEHR, B.; ABEDINI, A. Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulotyping of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolated from open-air fish markets. **BMC microbiology**, v.15, n.1, p.144, 2015

ROBERTS, M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**, v.245, n.195– 203, 2005

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V Epidemiology of Human Listeriosis.. **Clinical Microbiology Reviews**. v.4, p.169-183, 1991.

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.