

PERFIL DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS DE *L. monocytogenes* PROVENIENTES DE SUSHIS

LAÍS ABREU ANASTÁCIO¹; DIEGO PERES ÁVILA², LUÍZ GUSTAVO BACH²,
NATALIE RAUBER KLEINUBING², TASSIANA RAMIRES²; WLADIMIR PADILHA
DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com; lugubach@hotmail.com;
nataliek10@hotmail.com; tassianaramires@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O sushi é um alimento típico da cultura japonesa, cuja popularidade tem crescido muito no Brasil (IBGE, 2019). Esse alimento é considerado pronto para o consumo e pertence à categoria dos alimentos que são constituídos por produtos de origem animal, elaborados sem emprego de calor e consumidos crus (BRASIL, 2019). Tais características possibilitam a contaminação do produto por microorganismos patogênicos (RAMIRES et al., 2020).

Dentre as bactérias patogênicas de interesse em alimentos, *Listeria monocytogenes* destaca-se por ser comumente associada a surtos alimentares causados pela ingestão de Alimentos Prontos para o Consumo (APC) contaminados (LEPE et al., 2020). A infecção causada pelo patógeno é denominada listeriose e mais de 90% dos casos sistêmicos ocorrem pela ingestão de APC (EFSA, 2018). Apesar de cursar com sintomatologia branda, geralmente autolimitante, pode evoluir para sintomas mais graves, em casos de infecção sistêmica. A forma invasiva da doença afeta principalmente gestantes, idosos, recém-nascidos e imunocomprometidos. Sua taxa de letalidade é a mais alta causada por um patógeno de origem alimentar, atingindo em torno de 30% (LEPE, 2020).

As formas mais graves da doença são resultado da capacidade do patógeno de debelar barreiras imunológicas importantes, além de superar mecanismos fisiológicos do hospedeiro. Uma vez dentro de uma célula hospedeira, diversos fatores de virulência específicos permitem que o patógeno se multiplique e alcance diferentes tecidos (CAMEJO et al., 2011). Para tanto, muitos genes de virulência estão envolvidos na patogenicidade de *L. monocytogenes*, sendo que os mais importantes estão localizados na ilha de patogenicidade *Listeria 1* (LIPI-1); *prfA*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *mpl* e *actA* (HADJILOUKA et al., 2018); e ilha de patogenicidade *Listeria 2* (LIPI-2); *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ* (ZHANG et al., 2019).

Determinar o potencial de virulência dos isolados é importante, principalmente em termos de saúde pública, à medida que isso determina especificidades na patogenicidade de diferentes isolados de *L. monocytogenes*, influenciando na severidade da infecção e seu resultado clínico (TOLEDO et al., 2018; CHEN et al., 2020). Frente ao exposto, o objetivo do presente estudo foi detectar a presença de genes de virulência em seis isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de sushis comercializados em estabelecimentos especializados em culinária japonesa, do município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Foram avaliados seis isolados de *L. monocytogenes*, previamente caracterizados, provenientes de sushis comercializados em estabelecimentos do

município de Pelotas, Rio Grande do Sul (RAMIRES et al., 2016). O perfil de virulência dos isolados de *L. monocytogenes* foi avaliado pela presença dos genes da LIPI-1 (*hlyA*, *prfA*, *plcA*, *plcB*, *actA* e *mpl*), LIPI-2 (*inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*) e *iap*. As amplificações por PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando 12,5 µL de Gotaq® Green Master Mix, 10 pmol de cada par de *primer* e 10 ng (2 µL) de molde de DNA. As reações foram realizadas utilizando *primers* e condições previamente descritos (FURRER et al., 1991; BUBERT et al., 1999; PAZIAK-DOMANÈSKA et al., 1999; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001; LIU et al., 2007; CONTER et al., 2009; LOMONACO et al., 2012).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis isolados de *L. monocytogenes* avaliados neste estudo portavam os genes presentes na LIPI-1, assim como os genes *inlA*, *inlC*, *inlJ* e *iap*, diretamente relacionados à invasão na célula hospedeira (PADURO et al., 2020). A maioria dos casos de listeriose humana é relacionada essencialmente à infecção pelos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, sendo que o sorotipo 4b é o mais comumente isolado de amostras clínicas e o mais associado a surtos (BURALL et al., 2017). Neste estudo, todos os isolados pertenciam ao sorotipo 4b.

A patogenicidade de *L. monocytogenes* está relacionada a muitos genes de virulência, entre eles, os genes *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*, os quais codificam para proteínas denominadas de internalinas. As proteínas internalinas A e B são responsáveis pela internalização do patógeno nas células epiteliais intestinais e em células não epiteliais, respectivamente (PENTECOST et al., 2010; CHEN et al., 2011). Montero et al. (2015) relatam que o gene *inlA* é mais frequente do que *inlB* entre isolados de *L. monocytogenes*, corroborando o resultado do presente estudo, em que 100% dos isolados (6/6) albergaram o gene *inlA*, enquanto 66,7% dos isolados (4/6) albergaram o gene *inlB*. Os genes *inlC* e *inlJ* foram identificados em todos os isolados avaliados neste estudo. Segundo dados da literatura, as proteínas codificadas por esses genes estão intimamente associadas à infecção pós-intestinal (MILILLO et al., 2012). Além disso, Liu et al. (2007) relatam que a presença dos genes *inlC* e *inlJ*, evidencia o potencial de virulência de isolados de *L. monocytogenes*. O gene *iap* também é relacionado à invasão celular, codificando para a proteína extracelular p60 (CHANDRABOS et al., 2015). De acordo com Faith et al. (2007), na ausência desse gene há diminuição da motilidade intracelular do patógeno.

Os genes da LIPI-1 (*actA*, *hlyA*, *mpl*, *plcA*, *plcB* e *prfA*) estão associados a diferentes estágios da infecção por *L. monocytogenes* (CAMEJO et al., 2011). O gene *prfA* codifica para a proteína PrfA, relacionada à transcrição dos principais genes de virulência em *L. monocytogenes*, incluindo aqueles localizados na LIPI-1 (LOBEL et al., 2015). A listeriolisina O (codificada por *hlyA*) é a principal responsável pela evasão dos fagossomas nas células hospedeiras, e atua juntamente à fosfatidilinositol-fosfolipase C (PI-PLC, codificada pelo gene *plcA*) e a fosfatidilcolina-fosfolipase C (PC-PLC, codificada pelo gene *plcB*) (CAMEJO et al., 2011). A PC-PLC é expressa como uma pró-enzima e sua maturação depende de uma metaloprotease codificada pelo gene *mpl* (Marquis & Hager, 2000). O gene *actA* codifica para uma proteína responsável pela propulsão e deslocamento bacteriano no citoplasma da célula hospedeira, além da propagação célula a célula de *L. monocytogenes* (Travier et al., 2013).

Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente por Zhang et al. (2019). Os autores observaram que sete de oito isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushis, portavam os genes presentes na LIPI-1, bem como todos os oito isolados albergavam os genes *inlA*, *inlB*, *inlC* e *inlJ*. No Chile, Paduro et al.

(2020) avaliaram 365 isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de amostras clínicas (n=40) e de alimentos variados (n=325). Do total de isolados, 146 (40%) pertenciam ao sorotipo 4b e desses, 21 foram provenientes de amostras clínicas. Segundo os pesquisadores, a presença de *hlyA*, *prfA*, *inlA* e *inlB* foi maior no sorotipo 4b de *L. monocytogenes*, o que pode estar relacionado à maior ocorrência de listeriose humana causada por esse sorotipo.

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *L. monocytogenes* avaliados carregam os genes *inlA*, *inlC*, *inlJ* e *iap*, bem como os genes da LIPI-1 (*prfA*, *plcA*, *plcB*, *hlyA*, *mpl* e *actA*). O gene *inlB* não foi detectado em dois isolados. Os resultados são importantes à medida que a presença de tais genes sugere o potencial de virulência dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushis comercializados no município de Pelotas, Rio Grande do Sul.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BUBERT et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v65, p4688-4692, 1999.
- BURALL et al. A Comprehensive Evaluation of the Genetic Relatedness of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Variant Strains. **Front Public Health**, v5, article 241, 2017.
- BRASIL. **INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60**. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 2019.
- CAMEJO et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, v2(5), p379–394, 2011.
- CHANDRABOS et al. The p60 and NamA autolysins from *Listeria monocytogenes* contribute to host colonization and induction of protective memory. **Cellular Microbiology**, v17(2), p147–163, 2015.
- CHEN et al. Genetic diversity and profiles of genes associated with virulence and stress resistance among isolates from the 2010-2013 interagency *Listeria monocytogenes* market basket survey. **PLoS One**, v15(4), 2020.
- CHEN et al. Variation in *Listeria monocytogenes* dose responses in relation to subtypes encoding a full-length or truncated internalin A. **Applied and Environmental Microbiology**. v77, p1171–1180, 2011
- CONTER et al. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.497-500, 2009.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2018. RICCI et al. *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. **Scientific Opinion: EFSA Journal**, janeiro de 2018. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5134>
- FAITH et al. A P60 mutant of *Listeria monocytogenes* is impaired in its ability to cause infection in intragastrically inoculated mice. **Microbial Pathogenesis**, v42, p237–241, 2007.
- FURRER et al. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. **Journal of Applied Bacteriology**, Switzerland v70, p372-379, 1991.

- HADJILOUKA et al. Genetic Analysis of the *Listeria* Pathogenicity Island 1 of *Listeria monocytogenes* 1/2a and 4b Isolates. **Current Microbiology**, v75(7), p857–865, 2018.
- IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017 – 2018: Primeiros Resultados**. Agência de Notícias do IBGE. Rio de Janeiro, 04 de outubro de 2019. Acessado em 24 de julho de 2020. Online. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101670.pdf>
- LEPE, A. J. Current aspects of listeriosis. **Medicina Clínica**, Spain, v. 154, n. 11, p. 453-458, 2020.
- LIU, et al. A multiplex PCR for species-and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v71(2), p133–140, 2007.
- LOBEL et al. The metabolic regulator CodY links *Listeria monocytogenes* metabolism to virulence by directly activating the virulence regulatory gene *prfA*. **Molecular Microbiology**. v95, p624–644, 2015.
- LOMONACO et al. Detection of virulence-associated genes and epidemic clone markers in *Listeria monocytogenes* isolates from PDO Gorgonzola cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v160, p76-79, 2012.
- MARQUIS, H., & HAGER, E. J. pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v35(2), p289–298, 2000.
- MILILLO et al. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v52(8), p712–725, 2012
- MONTERO et al. Molecular epidemiology and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from a wide variety of ready-to-eat foods and their relationship to clinical strains from listeriosis outbreaks in Chile. **Frontiers in Microbiology**, v6(APR), p1–8, 2015.
- PADURO et al. Ten years of molecular epidemiology surveillance of *Listeria monocytogenes* in Chile 2008–2017. **Food Microbiology**, 85 103280, 2020
- PAZIAK-DOMANÈSKA et al. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. **FEMS Microbiology Letters**, Poland, v171, p209-214, 1999
- PENTECOST et al. *Listeria monocytogenes* internalin B activates junctional endocytosis to accelerate intestinal invasion. **PLoS Pathog**, v6(5), e1000900, 2010
- RAMIRES et al. First report of *Escherichia coli* O157:H7 in ready-to-eat sushi. **Journal of Applied Microbiology**, Brazil, 2020.
- RAMIRES et al. Isolamento e perfil de resistência a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* provenientes de sushis comercializados na cidade de Pelotas-RS. In: **XVIII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 1., Pelotas, 2016, **Anais...** Pelotas: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, 2016.
- TOLEDO et al. Genomic Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated from Clinical and Non-Clinical Samples in Chile. **Genes**, Chile, v9(8), 2018.
- TRAVIER et al. ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. **PLoS Pathogens**, v9(1), 2013.
- VÁZQUEZ-BOLAND et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v14(3), p584–640, 2001.
- ZHANG et al. Prevalence, Genotypic Characteristics and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* From Retail Foods in Bulk in Zhejiang Province, China. **Frontiers in Microbiology**, v10, p1–14, 2019.