

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *iap* DE *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE
ALIMENTOS NO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação de Mestrado

Jozi Fagundes de Mello

Porto Alegre, Brasil.

Janeiro 2007.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *iap* DE *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE
ALIMENTOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Jozi Fagundes de Mello

Nutricionista (Instituto Metodista de Educação e Cultura - IMEC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Porto Alegre, Brasil.

Janeiro 2007.

Jozi Fagundes de Mello

Nutricionista (IMEC)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do Grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007

Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 04/04/2007

Por:

JEVERSON FRAZZON
Orientador – PPGCTA/UFRGS

ERNA VOGT DE JONG
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA).

MARISA DA COSTA
Co-orientadora – PPGMAA/UFRGS

ANA PAULA GUEDES
PPGMAA/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS.

JÚLIO XANDRO HECK
ICTA/UFRGS

PLINHO HERTZ
PPGCTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo auxílio e iluminação em todas etapas da minha vida.

À minha mãe querida, meu eterno agradecimento pelo apoio, confiança em todas e quaisquer situações. Aos amigos e familiares pela compreensão dos momentos em que estive ausente e por todos os incentivos.

Aos colegas de mestrado da turma de 2005 pela amizade e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório 209N por todos momentos que passamos juntos.

A todos os professores do PPGCTA.

Uma lembrança em especial aos amigos Cristina Zaffari, Flávia Pinto, Professor Plinho Hertz e Professora Erna Vont Jong pela confiança, amizade, ensinamentos, incentivo e auxílio.

Ao Professor Rui Lopes pelo apoio, bom humor e “empréstimo” do termociclador, o que realmente viabilizou a realização desta pesquisa.

Ao Professor Gian Carlo Pasquali e aos amigos do Laboratório de Biologia Vegetal do Centro de Biotecnologia – UFRGS por todo suporte tecnológico necessário para realização deste estudo. A Professora Ana Paula Guedes por todo suporte oferecido, amizade e alegria.

Agradeço em especial à Professora e amiga Marisa da Costa por ter sido a primeira pessoa que me aceitou “em seu” laboratório como voluntária, possibilitando meu acesso à pesquisa. Agradeço seu voto de confiança e ao brilhante exemplo de postura profissional.

Um agradecimento muito especial para a pessoa que foi de fundamental importância em todas as etapas do mestrado acadêmico, tomou papel decisivo e imprescindível em todas situações boas ou ruins, quem me despertou o fascínio pela ciência: muito obrigada ao Professor Jeverson Frazzon. Também agradeço ao meu amigo “Je”, pelos ensinamentos, pela confiança e amizade.

Aos professores membros da banca examinadora pela importante contribuição neste trabalho.

MELLO, Jozi Fagundes de. ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *iap* DE *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE ALIMENTOS NO RIO GRANDE DO SUL. Orientador: Prof. Dr. Jeverson Frazzon. Co-orientadora: Profa. Dra. Marisa da Costa

RESUMO

A bactéria *Listeria monocytogenes* é reconhecida como um importante patógeno humano estando amplamente distribuída no ambiente e é responsável pela contaminação de alimentos crus e processados. O mecanismo de patogenicidade é determinado pela presença de genes no cromossomo da bactéria e entre eles estão os genes *iap* e *hly* que são essenciais para o mecanismo de invasão e atividade hemolítica do microorganismo, respectivamente. O objetivo do presente estudo foi confirmar as cepas de *L. monocytogenes* usando a técnica de PCR para o gene *hly* e análise da variação nucleotídica do domínio central do gene *iap*, que é caracterizado pela presença de seqüências repetidas dos aminoácidos treonina e asparagina. Vinte e seis cepas de *L. monocytogenes*, previamente isoladas de produtos lácteos e identificadas por métodos clássicos, se mostraram positivas para a PCR espécie-específico e então submetidas à determinação da seqüência nucleotídica. Os resultados mostraram variações na seqüência nucleotídica contendo substituições, inserções, deleções e um número de seqüências similares entre as cepas isoladas e a cepa controle EGD-e. Vinte e três cepas exibiram a mesma deleção que compreende 24 pares de bases dentro da seqüência de repetição e alterações similares na proteína traduzida. Apenas três cepas mostraram tamanhos diferentes de deleções e diferentes alterações na proteína. De acordo com estes resultados, a maioria das cepas apresentou uma característica molecular comum, diferentes da cepa padrão e este perfil predominante pode ser considerado como a característica das *L. monocytogenes* isoladas de produtos lácteos no Sul do Brasil.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; genes *iap* e *hly*; alimentos processados e crus, treonina, asparagina.

MELLO, Jozi Fagundes de. MOLECULAR ANALISYS OF *iap* GENE OF *Listeria monocytogenes* ISOLATED FROM FOODS ON RIO GRANDE DO SUL. Advisor: Prof. Dr. Jeverson Frazzon. Co-advisor: Profa. Dra. Marisa da Costa

ABSTRACT

The bacterium *Listeria monocytogenes* is recognized as an important human pathogen being omnipresent in the environment and is responsible for contamination in raw and processed foods. The mechanism of pathogenicity is established by presence of some genes on chromosome of bacteria between them, *iap* and *hly* genes that are essential to the invasion mechanism and hemolytic activity of microorganism, respectively. The aim of present study was confirm the strain *L. monocytogenes* using PCR to *hly* gene and analysis the nucleotide variability of central domain of *iap* gene characterized by the presence of similar sequences of threonine and asparagine amino acids. Twenty-six strains previously isolated from dairy products and classified by classic methods to *L. monocytogenes* were positive to specie-specific PCR and than submitted to nucleotide sequence determination. The results showed a sequence variation containing nucleotide substitutions, insertions, deletions and a number of repeated sequences among the isolates and control strain EGD-e. Twenty-three strains exhibited the same gap that includes a deletion of 24 base pairs inside of the repeated sequence and similar alterations in the translated protein. Just three strains showed different sizes of gaps and different protein alterations. According to these results, the majority strains displayed a common molecular characteristic different from the strain pattern and this predominant profile can be considerate as characteristic to *L. monocytogenes* isolated from dairy products in South Brazil.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *iap* and *hly* genes; raw and processed foods, threonine and asparagine.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	<i>Listeria</i> sp.	12
1.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.3	Isolamento de <i>Listeria</i> sp.....	15
1.4	Listeriose	15
1.4.1	Listeriose no Brasil e no mundo	17
1.4.2	Listeriose: mecanismo de invasão celular	18
1.5	<i>L. monocytogenes</i> e a indústria de alimentos	20
1.6	Genoma de <i>L. innocua</i> e <i>L. monocytogenes</i>	22
1.7	Fatores de virulência	23
1.7.2	Hemolisina - Gene <i>hly</i>	26
1.7.3	Organização genética dos fatores de virulência.....	27
1.8	Caracterização molecular de <i>L. monocytogenes</i>	29
2	ARTIGO CIENTÍFICO	31
3	DISCUSSÃO GERAL	47
3.1	Caracterização do gênero <i>Listeria</i> pelo uso do gene <i>iap</i>	47
3.2	Caracterização da espécie <i>L. monocytogenes</i> pelo uso do gene <i>hly</i>	49
3.3	Amplificação da região central do gene <i>iap</i> de <i>L. monocytogenes</i>	51
3.4	Análise da seqüência nucleotídica da região central do gene <i>iap</i>	52
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Testes bioquímicos empregados para diferenciar as espécies de *Listeria* sp... 14

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida intracelular da <i>L. monocytogenes</i>	20
Figura 2 – Proteínas sintetizadas em <i>L. monocytogenes</i> envolvidas no ciclo intracelular	25
Figura 3 – Esquema da organização dos genes na Ilha de Patogenicidade 1 de <i>L. monocytogenes</i>	28
Figura 4 - Caracterização molecular de <i>Listeria</i> sp. pela amplificação do gene <i>iap</i> utilizando os primers GF e GR. Eletroforese em gel de agarose 1%.	48
Figura 5 - Análise da especificidade dos primers GF e GR utilizado na amplificação de diversos gêneros microbianos. Eletroforese em gel de agarose 1%.	49
Figura 6 - Caracterização molecular da espécie <i>Listeria monocytogenes</i> pelo uso dos primers LF e LR correspondentes ao gene <i>hly</i> . Eletroforese em gel de agarose 1%.	50
Figura 7 - Amplificação da região central do gene <i>iap</i> pelo uso dos primers SI4AD e SI4BD	51

LISTA DE ABREVIações

A: Adenina

APPCC: Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle

ATCC: "American Type Culture Collection"

°C: Graus Celsius

C: Citosina

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

G: Guanina

G + C: Conteúdo Guanina e Citosina

Kb: Quilobase

KDa: Quilodálon

Mb: Megabase

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

pb: pares de base

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

T: Tiamina

UFC: Unidade Formadora de Colônia

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônia por grama

1 INTRODUÇÃO

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno ubíquo que pode ser transmitido por alimentos e é de grande importância para saúde pública, pois pode causar uma das mais severas infecções alimentares, a listeriose. A listeriose diferencia-se das demais infecções alimentares por possuir um extenso período de incubação. Inicialmente, apresenta-se de maneira assintomática e, posteriormente, dissemina-se rapidamente no organismo invadido. As manifestações clínicas desta infecção são de muita gravidade, sendo relatado que em torno de 30% dos casos geralmente o paciente vai a óbito.

Já foram diagnosticados inúmeros casos de listeriose em países da Europa, América do Norte e Ásia. No Brasil, ainda não há informações sobre a incidência desta infecção em humanos, entretanto, pesquisas recentes relatam a presença de *L. monocytogenes* e *Listeria* sp. em uma grande variedade de alimentos, e a simples detecção do gênero *Listeria* em alimentos é bastante relevante, uma vez que serve como indicador para a presença da espécie patógena *L. monocytogenes*.

Diferente da maioria dos patógenos humanos, *Listeria* sp. apresenta uma capacidade especial de crescer em temperaturas de refrigeração, aumentando o risco de contaminação de alimentos. Alguns grupos de alimentos destacam-se por sua recorrência na presença de *L. monocytogenes*, entre eles, os alimentos prontos para consumo, carnes e seus derivados, assim como os produtos lácteos. A produção e o armazenamento de alimentos em condições inadequadas de higiene são os principais fatores que contribuem para a presença de uma grande diversidade de microbiota nos alimentos produzidos, incluindo patógenos como a *L. monocytogenes*.

A partir dos anos oitenta, com o avanço da biologia molecular, foram introduzidos métodos sensíveis e rápidos para detecção e caracterização do microrganismo. No ano 2000, um consórcio de laboratórios vinculados ao Instituto Pasteur, de Paris, na França, divulgou o seqüenciamento genômico de duas espécies de *Listeria*: *Listeria innocua* e *L. monocytogenes*. O conhecimento da estrutura gênica de *L. monocytogenes* tem possibilitado o entendimento de diversos mecanismos de ação desta bactéria,

principalmente em relação aos mecanismos moleculares de virulência. O conhecimento dessas seqüências estabeleceu de forma mais precisa uma correlação de variabilidade genética entre isolados, o que tem possibilitado a realização de levantamentos sobre as variações gênicas inter e intra-espécies, ampliando dessa maneira os conhecimentos sobre este patógeno humano.

Com o objetivo de auxiliar na ampliação dos conhecimentos sobre este importante patógeno humano, o presente estudo teve como objetivo geral analisar o gene *iap* de *Listeria monocytogenes* isoladas de diversos alimentos do Estado do Rio Grande do Sul (RS). Entre os objetivos específicos, cita-se: 1) caracterizar o gênero *Listeria* pela amplificação da região N-terminal do gene *iap*; 2) caracterizar a espécie *L. monocytogenes* pela amplificação do domínio central do gene *hly*; 3) determinar a variação nucleotídica da espécie *L. monocytogenes* por amplificação e seqüenciamento do domínio central do gene *iap*.

1.1 *Listeria* sp.

Bactérias do gênero *Listeria* são classificadas em seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeii*, *Listeria innocua* e *Listeria grayi* (VOLOKHOV et al., 2002). A *L. monocytogenes* é a espécie patogênica a humanos e animais. Ocasionalmente, a *L. ivanovii* é patogênica a animais, enquanto que as demais espécies são consideradas não-patogênicas (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999). Essas bactérias estão amplamente distribuídas no meio ambiente e podem ser encontradas no solo, no esgoto, em vegetação deteriorada, em fezes de animais, em silagens, na água e em alimentos (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999).

Os membros do gênero *Listeria* são definidos como bastonetes Gram positivos, não-formadores de esporos, medindo de 0,5 a 2,0 micrômetros (μm) de comprimento por 0,5 μm de diâmetro (JAY, 2005). As células bacterianas podem apresentar-se formando pequenas correntes, com arranjos em ângulos, originando uma forma de “V”,

ou em grupos paralelos longitudinalmente. São móveis em temperatura de 20 a 25°C, em ágar semi-sólido, e produzem motilidade característica chamada “guarda-chuva”. Possuem flagelos peritríquios que possibilitam a motilidade por movimentos rotatórios ou por tombamento (SEELIGER; JONES, 1986). São bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas, possuem metabolismo fermentativo para glicose, hidrolisam esculina, são catalase positiva e oxidase negativa. Apresentam crescimento em temperaturas entre 1 e 45°C, mas a faixa ótima de temperatura é entre 30°C e 37°C (SEELIGER; JONES, 1986). Por possuírem capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração, esses microrganismos são caracterizados como psicrotolerantes. *Listeria* sp. são inativadas por tratamento térmico de 60°C por trinta minutos. As espécies do gênero *Listeria* desenvolvem-se em uma faixa de pH de 4,1 até 9,6 e apresentam melhor crescimento em valores de pH entre 6 e 8 (SEELIGER; JONES, 1986). Outro fator de destaque é a adaptação e sobrevivência da *Listeria* sp. em ambientes com altas concentrações de sal (10% NaCl) e de bile (de 10 a 40%) (JAY, 2005).

Estes microrganismos são discriminados pela sorotipificação que se baseia nas diferenças sorológicas de polissacarídeos capsulares, que permite a divisão dos microrganismos em sorovares distintos. Foram determinados dezessete sorovares em *Listeria*. Essa grande diversidade antigênica do gênero pode estar relacionada com o extenso número de animais hospedeiros.

1.2 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é um patógeno intracelular potencialmente letal (SCHMID et al., 2005). Morfologicamente, apresenta-se da mesma forma que as demais espécies do gênero, mas possui algumas características bioquímicas que a distinguem das demais. Bioquimicamente, caracteriza-se por produzir compostos ácidos a partir de L-ramnose e α -metil-D-manosídio. Tem atividade β -hemolítica em ágar sangue e apresenta Fator CAMP positivo com *Staphylococcus aureus*, mas não com *Rhodococcus equi*, conforme demonstrado na Tabela 1. No Teste CAMP, as cepas de

L. monocytogenes produzem uma reação hemolítica discreta, apresentando um halo de hemólise mais nítido nas proximidades das estrias de *S. aureus*. Estas características bioquímicas são importantes para a diferenciação entre a *L. monocytogenes* e as demais espécies. Dos dezessete sorovares característicos do gênero, *L. monocytogenes* apresenta a maior variedade antigênica, totalizando treze sorovares característicos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Entre esses sorovares, alguns são compartilhados com *L. innocua* (4ab) e *L. seeligeri* (1/2b, 4c e 4d). Em relação à *L. monocytogenes*, o sorovar 4b é freqüentemente isolado de produtos cárneos e de humanos, o sorovar 1/2a é comum em produtos lácteos e o 1/2b é comumente distribuído no ambiente (HOFER; RIBEIRO; FEITOSA, 2000). Dentre os alimentos que apresentam com maior freqüência a presença de *L. monocytogenes*, estão: leite cru, queijos, sorvetes, laticínios de uma forma geral, vegetais, frutas, carnes frescas, cozidas ou congeladas de várias espécies animais, como aves, bovinos, suínos, caprinos, ovinos e frutos do mar, além de alimentos prontos para consumo (BILLE; ROCOURT; SWAMINATHAN, 1999; REISSBRODT, 2004).

Tabela 1- Testes bioquímicos empregados para diferenciar as espécies de *Listeria* sp.

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>
β – hemólise	+	+	+	-	-
CAMP teste					
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-
<i>R. equi</i>	-	+	-	-	-
Produção de ácido					
Manitol	-	-	-	-	-
Ramnose	+	-	-	+/-	+/-
Xilose	-	+	+	-	-

Fonte: Adaptado de Faber et al. (1991).

+ positivo; - Negativo; +* Fraca positiva; +/- Variável.

1.3 Isolamento de *Listeria* sp.

A forma tradicional de detecção de *L. monocytogenes* baseia-se no isolamento microbiológico por enriquecimento em meio seletivo. A detecção geralmente contempla o enriquecimento em meio líquido e a posterior inoculação em meio sólido seletivo diferencial (LUNGE, 2000). Pode-se fazer o isolamento através da contagem pela técnica de semeadura direta, técnica dos tubos múltiplos, métodos da “Food and Drug Administration” (FDA) e da “United States Department of Agriculture” (USDA), além de testes sorológicos como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA). Os métodos comumente empregados em laboratórios são os recomendados pela FDA e da USDA. Para diferenciação das espécies, os isolados suspeitos são submetidos a uma série de testes bioquímicos que contemplam algumas características específicas para diferenciação das espécies.

1.4 Listeriose

Listeriose ou listeríase é a infecção causada pela bactéria *L. monocytogenes*, que acomete mamíferos, aves, peixes e crustáceos. O primeiro caso de listeriose humana foi registrado na Dinamarca, em 1929, mas a primeira cultura de *L. monocytogenes* data de 1921, na França, onde foi isolada de um paciente portador de meningite (VÁZQUES-BOLAND et al., 2001b). Desde 1981, investigações de surtos e casos esporádicos têm indicado que o alimento contaminado é a fonte mais freqüente da rota de transmissão desta doença. Em 1988, a Organização Mundial da Saúde reconheceu que o consumo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* é a fonte primária de transmissão da listeriose humana (ROCOURT, 1996). Os índices de mortalidade referidos para listeriose variam de 20 a 30% (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Esta infecção acomete indivíduos do chamado grupo de risco. Fazem parte desse grupo: gestantes, fetos, recém-nascidos, crianças, idosos e indivíduos de

qualquer faixa etária que tenham o sistema imunológico comprometido (VOLOKHOV, et al., 2002).

Os sinais clínicos da listeriose são muito similares em todos os indivíduos infectados. Há duas formas básicas de apresentação da doença: listeriose feto-maternal, neonatal e listeriose em pacientes adultos. A listeriose feto-maternal, ocorre através da disseminação da bactéria ao feto via placenta, o que pode ocasionar aborto e parto prematuro, além de óbito de bebês. Geralmente, esse processo infeccioso é assintomático para a gestante ou apresenta sintomas difusos semelhantes a um resfriado, com dores de cabeça, fadiga, calafrios, dores musculares e articulares. A listeriose neonatal ocorre com menos freqüência. Normalmente se dá entre a primeira e a oitava semana após o parto. Os recém-nascidos podem apresentar febre, meningite, septicemia e, em alguns casos, gastroenterite e pneumonia. Neste tipo de listeriose, a taxa de mortalidade é baixa (10 a 20%) podendo apresentar aos bebês, seqüelas como hidrocefalia ou retardamento motor. Em adultos, as manifestações clínicas geralmente ocorrem em conseqüência da sensibilização do Sistema Nervoso Central, causadas pela infecção do parênquima cerebral e se apresentam na forma de meningite e encefalite. Outras manifestações clínicas não muito comuns são endocardite, miocardite, artrite, pleurite, hepatite, peritonite, abscessos localizados, sinusite, otite e conjuntivite (ROCOURT, 1996).

O diagnóstico da listeriose pode ser feito através de culturas de sangue, líquido cérebro-espinhal, líquido amniótico, secreções respiratórias, placentárias, cutâneas ou mecônio de neonato. O período de incubação e a dose infectiva mínima, ainda hoje, não estão bem definidos. A ingestão de 10^2 a 10^3 células viáveis pode ser letal a fetos, crianças e adultos (FARBER; PETERKIN, 1991). Esse número de células viáveis pode variar conforme a virulência da cepa bacteriana, a susceptibilidade do hospedeiro e o pH do suco gástrico. Segundo JAY (2005), inóculos de 10^5 e 10^6 *L. monocytogenes* são letais para ratos adultos normais. A Comissão Internacional de Especificação em Microbiologia para Alimentos estima que 100 Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g) de alimento são aceitáveis para indivíduos que não se enquadram no grupo de risco (RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2004). O período de incubação da

listeriose é muito longo e pode variar de poucos dias a dois ou três meses, o que dificulta a identificação da fonte de contaminação.

A *L. monocytogenes* geralmente é sensível a uma grande quantidade de drogas, como vancomicina, rifampicina, tetraciclina, eritromicina, gentamicina, ampicilina e penicilina. Uma cepa de *L. monocytogenes* já se apresentou resistente a trimetopim. A maioria dos antibióticos age como bacteriostáticos para *L. monocytogenes*, mas os aminoglicosídeos apresentam-se como bactericidas. Nos tratamentos clínicos, os mais utilizados são a penicilina ou ampicilina (OTEO; ALÓS, 1997).

1.4.1 Listeriose no Brasil e no mundo

Já foram diagnosticados casos isolados e surtos de listeriose em vários países do mundo. Destacam-se alguns países da Europa e da América do Norte, com centenas de casos intermitentes de 1976 a 2001 (MCLAUCHLIN et al., 2004). Em 1981, ocorreu o primeiro grande surto de listeriose na província de Maritime, no Canadá, acometendo aproximadamente 34 gestantes, este surto foi associado ao consumo de salada de repolho contaminada com adubo orgânico proveniente de ovinos portadores de *L. monocytogenes* (LOW; DONACHIE, 1997). Em 1983, houve a ocorrência de 49 casos de listeriose em Massachusetts, nos Estados Unidos da América (EUA); entre todos os indivíduos acometidos pela infecção, sete eram recém-nascidos e 42 adultos. Neste surto catorze indivíduos faleceram. Esses casos foram relacionados com a ingestão de leite pasteurizado contaminado. Em 1985, em Los Angeles, nos EUA, ocorreram cem casos confirmados da infecção, apresentando quarenta mortes. A disseminação do surto aconteceu pelo consumo de queijo tipo mexicano (BAHK; MARTH, 1990).

No Brasil, até o momento, ainda não foram divulgados surtos de listeriose. Neste país há uma relativa falta de informações disponíveis. No período de abril a dezembro de 1985, foram diagnosticados cinco casos de listeriose em pacientes que haviam sido submetidos a transplante renal em um mesmo hospital da cidade de São Paulo. Foram reconhecidos dois sorovares de *L. monocytogenes*: 1/2a e 4b, sendo que este último

apresentava resistência ao antibiótico penicilina (HOFER; MELLES; HOFER, 1999). Em 1989, o Instituto de Saúde do Distrito Federal diagnosticou três casos de meningite causada por *L. monocytogenes* a partir da análise do líquido-cefalorraquidiano, com diagnóstico prévio de meningite bacteriana, resultando em um óbito (HOFER; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1998). Schwab e Edelweiss (2003) analisaram, através da técnica de imuno-histoquímica, placentas humanas provenientes de abortos, de partos prematuros e de nascimentos a termo registrados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi identificada a presença de *L. monocytogenes* em 33,7% das amostras, o que indica que a técnica de imuno-histoquímica pode ser utilizada para confirmação da presença desta bactéria em placentas. No ano de 2005, foi divulgada uma pesquisa que analisou características fenotípicas de espécies e sorovares prevalentes de *Listeria* sp., isoladas de animais portadores e doentes provenientes de diversas regiões do Brasil. Houve o predomínio de *L. innocua* sorovar 6a, seguida de *L. monocytogenes* 4b. A espécie patogênica foi encontrada em maior prevalência nos ruminantes, roedores e canídeos (HOFER; REIS, 2005).

1.4.2 Listeriose: mecanismo de invasão celular

Como importante fator de ação para a instalação do patógeno e disseminação da infecção, a *L. monocytogenes* apresenta um mecanismo específico de invasão de células fagocíticas e não-fagocíticas, como macrófagos, células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, hepatócitos e vários tipos de células nervosas, como, por exemplo, os neurônios (COSSART, 2002; HAIN; STEINWEG; CHAKRABORTY, 2006). A forma mais comum de contaminação desta bactéria é pela ingestão de alimentos contaminados, portanto, o trato gastrointestinal é a principal porta de entrada para a bactéria no hospedeiro. Depois da ingestão do alimento contaminado, as células bacterianas conseguem resistir às adversidades do interior estomacal e chegam ao intestino. Em poucos minutos, elas atravessam o epitélio intestinal e iniciam a reprodução intracelular. Aproximadamente um a dois dias após sua penetração, as bactérias são carregadas

pela linfa ou pela corrente sangüínea. A partir daí, o patógeno pode atingir os linfonodos, a placenta, o fígado e/ou o baço. Após esta etapa inicial, a bactéria promove uma rápida colonização dos tecidos invadidos. Usando o mesmo sistema de invasão celular, a espécie virulenta pode atravessar a barreira placentária e chegar ao feto, além de infectar o Sistema Nervoso Central. A capacidade que *L. monocytogenes* possui de invadir células não-fagocíticas deve-se a um mecanismo chamado “zipper type”. Neste mecanismo, a bactéria vai gradualmente sendo internalizada pela célula hospedeira até sua total entrada na mesma, ficando inicialmente envolta pela membrana celular. A partir de então, se inicia o ciclo de vida intracelular. Esse ciclo segue alguns passos já conhecidos. A espécie patogênica produz as toxinas Listeriolisina O (LLO) e a Fosfolipase C (PI- PLC), que acidificam o meio e rompem o vacúolo. Cerca de trinta minutos após sua entrada, a *Listeria* está livre no citosol (IRETON; COSSART, 1997). Uma vez no citosol, a bactéria multiplica-se, dobrando sua população em uma hora. Para sua locomoção dentro do citoplasma, a bactéria utiliza a motilidade chamada de cauda de actina. Essa cauda de actina realiza movimentos rotatórios que irão propulsar a bactéria pelo citosol até encontrar a membrana plasmática e chegar à célula adjacente. Então, a bactéria será novamente internalizada por vacúolo, porém, agora, este possui uma membrana dupla: uma formada pela primeira célula que já foi invadida e outra formada pela célula que está sendo invadida. A seguir, recomeça todo o ciclo de lise do vacúolo para cada célula vizinha até a colonização total do tecido (VÁZQUEZ -BOLAND et al., 2001a) (Figura 1). Cada uma das etapas descritas no processo de invasão celular está associada a diversos mecanismos de virulência.

Comparada a outras infecções alimentares, a listeriose apresenta um tempo de incubação longo. Isso indica que a colonização dos tecidos por *L. monocytogenes* envolve fases e mecanismos ainda desconhecidos.

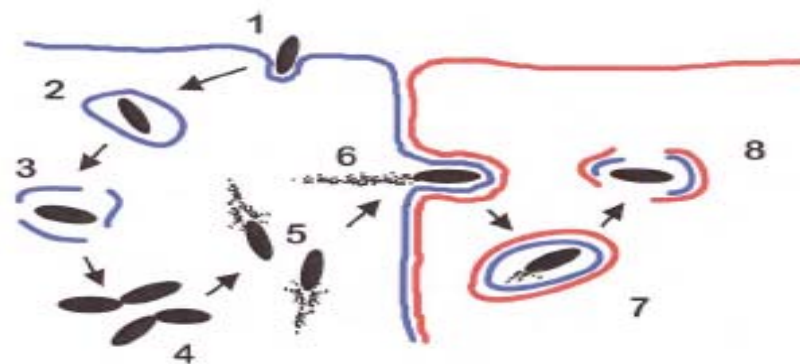


Figura 1 - Esquema do ciclo de vida intracelular da *L. monocytogenes*

1 – Entrada na célula do hospedeiro; 2 – Sobrevivência dentro do vacúolo fagocitário; 3 – Rompimento do vacúolo e escape para o citosol; 4 – Reprodução bacteriana no citosol; 5 – Motilidade pela cauda de actina; 6 – Propagação para célula adjacente; 7 – Sobrevivência no vacúolo secundário de dupla membrana; 8 – Escape do vacúolo secundário e reinício do ciclo.
 Fonte: Adaptada de Boland-Vázquez et al. (2001a).

1.5 *L. monocytogenes* e a indústria de alimentos

Alimento seguro pode ser considerado aquele que, mesmo contendo presença de microbiota, não apresenta risco significativo à saúde do público em geral (FORSYTHE, 2000). O controle da qualidade na produção de alimentos geralmente utiliza os padrões microbiológicos de matérias-primas e produtos finais, mas o tempo necessário para a obtenção dos resultados desses procedimentos é por vezes longo. O ideal é que as indústrias alimentícias utilizem procedimentos de produção, armazenamento e distribuição que garantam alimentos mais seguros. O emprego de técnicas eficientes pode reduzir significativamente o tempo de processamento e produzir uma margem adequada de segurança do produto final (TOKATLI; CINAR; SCHLESSER, 2005).

O sistema de Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) é um dos procedimentos mais indicados para proporcionar a produção de alimentos microbiologicamente seguros, pois estabelece sistemas específicos no controle de

perigos (SILVA et al., 2002). Entende-se por perigo quaisquer agentes químicos, biológicos ou físicos que possa comprometer a saúde do consumidor (JAY, 2005). A APPCC utiliza a análise dos perigos no que se refere às matérias-primas e ao processamento de cada produto, além de referenciar a responsabilidade do consumidor quanto à compra, à armazenagem e ao consumo de alimentos (CAPUNZO et al., 2004; JAY, 2005).

Apesar de nunca ter sido notificado nenhum surto de listeriose no Brasil, é comum o isolamento de *L.monocytogenes* a partir de alimentos disponíveis à população. Catão e Ceballos (2001) investigaram a qualidade microbiológica dos leites *in natura* e pasteurizados de uma indústria de laticínios no estado da Paraíba. A contagem para coliformes fecais e totais estava acima do padrão. Em 51,5% do leite cru e em 100% do leite beneficiado, foram isoladas *L. monocytogenes*. Esses dados sugerem que a contaminação pode ter ocorrido no processo de ensacamento ou armazenagem do leite, além de evidenciar deficiência higiênico-sanitária no processamento.

Silva et al. (2002) analisaram amostras de matéria-prima, produto final e amostras ambientais da planta de processamento de uma indústria produtora de queijo Minas Frescal no estado da Bahia. Os resultados apontaram a presença de 11,4% de *Listeria* sp. e 2,9% de *L. monocytogenes* nas amostras analisadas. A espécie patogênica (sorovar 4b) foi encontrada no leite cru, no piso da sala de armazenamento do queijo e também na fábrica de laticínios.

De acordo com Araújo et al. (2002) nas amostras de carne de peru (peças inteiras e fatiadas de “blanquet” e presunto) comercializadas em mercados varejistas da cidade de Niterói, no Rio de Janeiro, produzidas sob inspeção federal não foram encontradas *Listeria* sp. No “blanquet” de peru fatiado, foram encontrados 80% de *Listeria* sp. e 50% destas, eram da espécie patogênica. No presunto fatiado, foram encontrados 90% de *Listeria* sp. e 60% de *L. monocytogenes*. Os sorovares mais prevalentes da espécie virulenta foram 4b, 1/2c, 1/2b e 1/2a. A ausência de bactérias do gênero *Listeria* nas peças inteiras e a alta incidência nos produtos fatiados indicam provável manipulação e estocagem inadequada dos alimentos.

Frigoríficos produtores de lingüiça frescal, em Pelotas, no estado do RS, foram analisados por Silva et al. (2004). Foi obtido o isolamento de 29,3% de *L. monocytogenes* entre as amostras de matéria-prima, nos equipamentos e no próprio produto final.

Zaffari (2005) analisou oitenta amostras de queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do estado do RS. Como resultado das análises, encontrou 16% de *Listeria* sp. e 4% de *L. monocytogenes*. Também foi constatado que 26% de amostras apresentavam contagens de coliformes fecais acima do estabelecido pela legislação vigente, e, em 32% das amostras, foi isolado *Escherichia coli*. Esses resultados confirmam a necessidade de orientação aos produtores sobre normas de higiene para manipulação de alimentos.

Com base nos apontamentos de todos esses estudos citados, evidencia-se a necessidade e a grande importância do emprego de sistemas adequados de controle de qualidade na produção de alimentos que priorizem o necessário cuidado com a saúde pública.

1.6 Genoma de *L. innocua* e *L. monocytogenes*

Os mecanismos da patogenicidade do microrganismo *L. monocytogenes* têm sido mais bem entendidos nos últimos anos a partir da publicação do seqüenciamento completo do genoma de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por Glaser et al. (2001). Esse trabalho colaborou para a expansão de conhecimentos e para a compreensão dos mecanismos moleculares de patogenicidade, além de auxiliar no esclarecimento sobre questões evolutivas destas espécies. Um segundo consórcio publicou no ano de 2006 o seqüenciamento completo dos genomas de *L. welshimeri* e *L. seeligeri* (HAIN; STEINWEG; CHAKRABORTY, 2006). As quatro espécies de *Listeria* seqüenciadas apresentam um cromossomo circular que varia de 2,7 a 3,0 megabases (Mb) e possuem um conteúdo de Guanina e Citosina (G + C) que varia entre 36,4 e 41,5%. Toda a seqüência genômica codifica aproximadamente 2.800 proteínas.

Comparações entre os genomas das espécies *L. monocytogenes* e *L. innocua* mostram grande conservação na ordem e na orientação de alguns genes. Comparações do genoma de *L. monocytogenes* com o genoma de *Bacillus subtilis* e com o de *Staphylococcus aureus* também sugerem alta conservação na sua organização, revelando grande similaridade entre proteínas e presença de genes ortólogos (GLASER et al., 2001; BUCHRIESER et al., 2003). Mesmo considerando as semelhanças gênicas, é importante salientar que *L. innocua* e *B. subtilis* são espécies não-patogênicas, e isso corrobora com a sugestão de que as diferenças entre as espécies analisadas se devem à transferência horizontal de genes, o que provavelmente determinou a patogenicidade das espécies virulentas como *L. monocytogenes* e *S. aureus* (BUCHRIESER et al., 2003).

No genoma de *L. monocytogenes*, há a presença de 270 genes que estão ausentes em *L. innocua*. Esses genes estão espalhados no cromossomo em cem fragmentos de DNA, onde 60% destes possuem diferença significativa no conteúdo de G + C, indicando que estes fragmentos tenham sido adquiridos pelo microrganismo por transferência horizontal de genes (ABEE; SCHAİK; SIEZEN, 2004).

1.7 Fatores de virulência

Os determinantes moleculares de virulência dos microrganismos patogênicos têm sido bastante estudados nos últimos anos. Em *L. monocytogenes*, o potencial de patogênese está associado à sua capacidade de invadir, sobreviver e de se multiplicar dentro de células, inclusive nas células de defesa, como macrófagos (MENGAUD et al., 1988). Cada etapa do parasitismo intracelular de *L. monocytogenes* é resultado da expressão de algum fator de virulência (DUBAIL et al., 2000). Entre os processos de patogênese de *L. monocytogenes*, destaca-se o mecanismo de invasão celular, que se tornou um importante sistema de estudo de mecanismos moleculares do parasitismo intracelular.

De uma forma geral, os determinantes de virulência podem ser divididos em dois grupos: 1) determinantes moleculares envolvidos na adesão e na invasão de células eucarióticas e 2) determinantes moleculares envolvidos na vida intracelular (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). Dentre os determinantes moleculares relacionados com adesão e invasão celular, tem-se as internalinas (representadas pelas proteínas internalina A - InIA e internalina B - InIB), a proteína p60, a hemolisina e a ActA. Também desenvolvem ações importantes para vida intracelular estão as proteínas Listeriolisina O (LLO), ActA (polimerização de actina) e Hpt (transportador hexose-fosfato) (ERMOLAEVA, 2001; DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004).

Internalinas pertencem a um grupo de proteínas que apresentam repetições do aminoácido leucina (L) e são transcritas por uma família de genes exclusiva da espécie patogênica de *Listeria* (CABANES et al., 2002). Geralmente, os membros desta família são encontrados em agrupamentos de dois ou mais genes orientados na mesma direção, sendo, então, chamados de Ilhas de Internalinas. As primeiras internalinas a serem caracterizadas foram InIA (800 aminoácidos) e InIB (630 aminoácidos), codificadas pelos genes *inIA* e *inIB*, respectivamente. Essas são classificadas como proteínas de superfície covalentemente ligadas à camada de peptidoglicano por seus domínios carboxi-terminal e são denominadas proteínas LPXTG. Ambas conferem à *L. monocytogenes* a capacidade de invadir células não-fagocíticas. Proteínas de superfície agem como fatores de virulência, pois têm um papel importante na interação do microrganismo com o meio ambiente, em especial nas contaminações dos hospedeiros. Essas proteínas, em geral, são responsáveis pela adesão e entrada da bactéria na célula-alvo. Outra importante proteína que também está envolvida na adesão e invasão bacteriana é a proteína p60 (apresentada no item 1.7.1) (VÁZQUEZ-BOLAND, et al., 2001b).

Após a invasão celular, ocorre a atuação de outras proteínas envolvidas na criação e manutenção de condições favoráveis para vida intracelular: a LLO, a ActA, e a Hpt. A LLO, que é codificada pelo gene de hemolisina (*hly*), será descrita no sub-item 1.7.2. A ActA é responsável pela mobilidade dentro do citosol através da propulsão pela cauda de actina. A Hpt é pouco conhecida, mas acredita-se que seja responsável pela

obtenção de nutrientes para sobrevivência da bactéria (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004).

Como importante mecanismo de patogênese, também se destacam as fosfolipases. São enzimas produzidas pelas espécies patogênicas do gênero *Listeria*. Destacam-se as proteínas fosfolipase A (PlcA) e fosfolipase B (PlcB), que estão presentes em *L. monocytogenes*, e a (SmcL), que está presente na *L. ivanovii*. Essas proteínas têm ação concomitante com a LLO na lise do fagossomo primário (PlcA) e do fagossomo secundário (PlcB) (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a) (Figura 2).

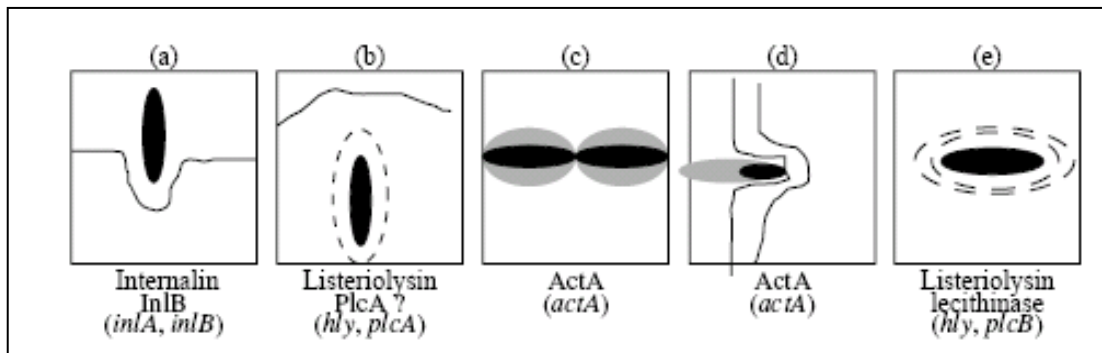


Figura 2 – Proteínas sintetizadas em *L. monocytogenes* envolvidas no ciclo intracelular

(a) proteína responsável pela entrada da bactéria na célula eucariótica – genes *inlA* e *inlB*; (b) mecanismos utilizados para lise do primeiro vacúolo – genes *plcA* e *hly*; (c) divisão bacteriana no citoplasma e formação inicial da cauda de actina – gene *actA*; (d) movimentação bacteriana promovida pela cauda de actina e difusão à célula adjacente; (e) proteínas utilizadas para lise do segundo vacúolo – genes *hly* e *plcB*.

Fonte: adaptada de Ermolaeva (2001).

1.7.1. Proteína p60 - Gene *iap*

A proteína p60 é a maior proteína extracelular de *L. monocytogenes* e tem aproximadamente 60 KDa. A proteína está associada à adesão da bactéria em células eucarióticas e é essencial para a hidrólise da mureína, necessária para a divisão celular bacteriana (BUBERT et al., 1997, 1999). A proteína p60 é codificada pelo gene *iap* (“invasion-associated protein”). O gene *iap* está presente em todas espécies de *Listeria*

(RODRIGUEZ-LÁZARO et al., 2004). Uma comparação no gene *iap* de todas as espécies mostrou a existência de uma conservação de aproximadamente cem e 120 aminoácidos nas regiões 5' fosfato terminal (5P) e 3' hidroxil terminal (3'-OH) (5' – 3'), respectivamente (PILGRIM et al., 2003). Já no domínio central da proteína p60, há uma característica exclusiva da espécie *L. monocytogenes*. Nessa porção central, há repetições dos aminoácidos treonina (T) e asparagina (N) (BUBERT et al., 1992). Pilgrim et al. (2003) testaram um mutante de *L. monocytogenes* com deleção do gene *iap*, e este apresentou alterações na divisão celular, originando cepas morfologicamente diferentes da forma selvagem.

1.7.2 Hemolisina - Gene *hly*

O gene da hemolisina, *hly*, foi o primeiro fator de virulência identificado e seqüenciado em *Listeria* sp. A Listeriolisina O (LLO) é uma proteína tóxica, de 58 a 60 kDa, codificada pelo gene *hly* (JACQUET et al., 2002). Esta proteína é composta por 504 aminoácidos, contendo apenas um resíduo de cisteína, que é fundamental para sua atividade (COSSART et al., 1989). Pertence à família de citolisinas colesterol-dependentes e formadoras de poros (CDC's) (KAYAL; CHARBIT, 2006). A esta família também pertencem toxinas produzidas por outros vinte e três microrganismos Gram-positivos de diferentes gêneros, como *Streptococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. e *Listeria* sp. (VÀZQUES-BOLAND et al., 2001). No entanto, a LLO é a única produzida por uma bactéria intracelular, ativada em pH ácido e capaz de auxiliar na saída do fagossomo. A LLO apresenta baixa atividade hemolítica em pH neutro e, em pH<6, apresenta atividade considerável. Ainda não são conhecidos os mecanismos moleculares que determinam a faixa de pH para a atividade da toxina (SCHUERCH; WILSON-KUBALEC; TWETEN, 2005).

A LLO tem uma ação importante no ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*. Permite que a bactéria escape dos vacúolos, primário e secundário, de defesa da célula invadida e, então, permaneça livre no citosol para sua multiplicação e

disseminação. Também possui ação citotóxica em células fagocíticas. A hemolisina provoca o rompimento da membrana celular e a formação de poros ou lesões na mesma. Esses poros possivelmente facilitam o acesso das fosfolipases e de seus substratos ao interior celular. As fosfolipases irão auxiliar na degradação final da membrana da própria célula invadida.

Há uma forte correlação entre a atividade hemolítica de LLO e capacidade de virulência das espécies do gênero. Contudo, o gene *hly* também está presente na espécie não-virulenta *L. seeligeri*, mas nesta espécie o gene não é expresso corretamente. Possivelmente, isso se deve à existência de substituição de um resíduo de alanina por uma fenilalanina no domínio conservado, além da inserção de fases abertas de leituras ou “Open Reading Frames” (ORFs) que interrompem a adequada ativação do gene *prfA* (DRAMSI; COSSART, 2002). A LLO é controlada pelo ativador peliotrópico PrfA e tem função semelhante à estreptolisina produzida por *Streptococcus pyogenes*. Mutantes de *L. monocytogenes* com LLO–negativo não apresentaram potencial patogênico em camundongos (DUBAIL et al., 2000; MENGAUD et al., 1988). A ação da toxina LLO, produzida pelo gene *hly*, é considerada a mais importante entre os fatores de virulência em *L. monocytogenes* (CHURCHILL; LEE; HALL, 2006).

1.7.3 Organização genética dos fatores de virulência

Os determinantes de virulência normalmente apresentam-se organizados em unidades gênicas. Essas unidades são conhecidas como Ilhas de Patogenicidade (PAIs). Geralmente, as PAIs apresentam um importante papel na evolução dos microrganismos, uma vez que são adquiridas por transferência horizontal de genes ou por elementos genéticos móveis (transposons). Os determinantes de virulência para invasão, adesão e vida intracelular estão compreendidos nesta organização gênica. Destacam-se o agrupamento central de genes de virulências e as ilhas de internalinas, devido à importância de ação no ciclo de vida da espécie patogênica de *Listeria* sp.

Uma das ações mais destacadas dos mecanismos de virulência de *L. monocytogenes* é o ciclo de vida intracelular. Neste ciclo, se inclui a capacidade de romper a barreira epitelial e endotelial do intestino, placenta e vasos sanguíneos do organismo invadido, além da capacidade de invasão e replicação em células eucariotas fagocíticas e não-fagocíticas. Em *L. monocytogenes*, os genes responsáveis por este ciclo de vida intracelular estão localizados em um *locus* cromossomal chamado de Ilha de Patogenicidade 1 (LIPI-1). Esta é uma ilha cromossomal de 9-Kb, onde estão contidos seis genes de grande importância para o parasitismo intracelular: *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* (Figura 3).

Nas espécies não-patogênicas do gênero *Listeria*, esse agrupamento de genes não é funcional. Isso se deve à presença de inserção entre dois genes no caso da *L. seeligeri* e de total ausência do agrupamento para as espécies *L. innocua* e *L. welshimeri*. A espécie *L. ivanovii* possui a estrutura genética da LIPI-1, mas esta apresenta um elevado grau de divergência genética, onde somente 73% da seqüência de DNA é semelhante, diferenciando geneticamente as duas espécies (VÁZQUES-BOLAND et al., 2001a).

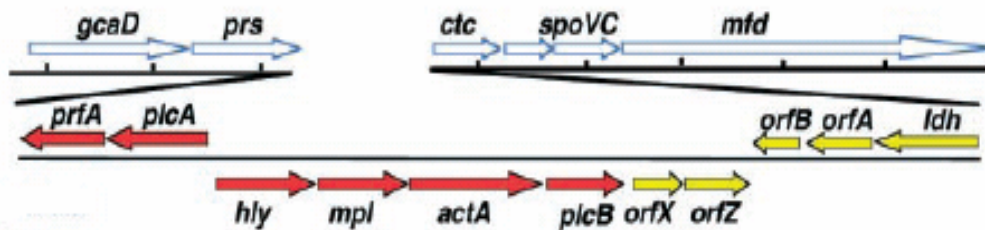


Figura 3 – Esquema da organização dos genes na Ilha de Patogenicidade 1 de *L. monocytogenes*

Setas em vermelho: agrupamento dos genes de virulência de *L. monocytogenes* pertencentes a LIPI-1; setas em amarelo e azul genes adjacentes à LIPI-1.

Fonte: adaptada de Glaser et al. (2001).

Outro importante agrupamento de genes são as internalinas. Estas são uma família de multigenes exclusiva para o gênero *Listeria* sp., na qual as proteínas codificadas apresentam um domínio variável no número de repetições do aminoácido leucina (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001b). O maior agrupamento de genes pertencentes a esta família é chamado de Ilha de Internalina 2 (LIPI-2). Estão contidos na LIPI-2 dez genes, e os de maior destaque, por sua ação no mecanismo de invasão celular, são *inIA* e *inIB* (mencionados anteriormente no item 1.7). Esse agrupamento de genes internalinas está presente em todo o gênero, contando com diferentes inserções entre as espécies (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001b).

1.8 Caracterização molecular de *L. monocytogenes*

Técnicas tradicionais de detecção microbiológica de contaminantes alimentares são eficazes e de grande importância. Porém, caracterizam-se por serem procedimentos laboriosos na detecção de patógenos potencialmente fatais, como *L. monocytogenes*. Procedimentos rápidos de detecção, baseados em técnicas moleculares, têm sido aplicados, e os resultados têm se mostrado eficientes, principalmente devido à sua alta sensibilidade e especificidade.

Vários métodos moleculares têm sido aplicados na caracterização de *Listeria* sp., como, por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Análise por Enzimas de Restrição (REA), Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE), Análise Randômica do DNA Polimórfico (RAPD), Técnica da Transcriptase-Reserva (RT-PCR), tipificação ribossomal, imuno-cromatografia, fluorescência e o seqüenciamento de bases nucleotídicas ou aminoácidos (GALL, 2001; REISSBRODT, 2004). A técnica PCR baseia-se na amplificação de genes-alvos que estejam envolvidos com o processo de patogênese. A análise dos produtos das reações também é de grande importância para a fidelidade do diagnóstico. As alternativas mais comuns são a eletroforese em gel de agarose e a hibridização em fase sólida.

Bubert et al. (1999) utilizaram a técnica de PCR Multiplex para diferenciação da espécie patogênica amplificando o gene *iap*. Os seus resultados indicaram que a PCR Multiplex pode ser perfeitamente utilizada para rápida identificação do gênero *Listeria* e confirmação da espécie de isolados de diferentes fontes. A técnica de RAPD foi usada por Byun, Jung e Yoo (2001) para tipificar *L. monocytogenes* isolada de carnes na Coreia, concluindo que esta técnica é bastante útil em estudos epidemiológicos de *L. monocytogenes*, além de outras bactérias. A PCR em tempo real foi empregada com sucesso para detecção e quantificação de *L. monocytogenes* e *L. innocua* por Rodriguez-Lázaro et al. (2004), no Reino Unido. Portanto, métodos moleculares de identificação, caracterização e análise da variabilidade vêm sendo muito utilizados na ampliação de conhecimentos sobre as características moleculares dos microrganismos.

Baseado em estudos preliminares, as técnicas de PCR, eletroforese em gel de agarose e seqüenciamento automático de bases nucleotídicas foi escolhida para a realização da presente pesquisa. Entre os objetivos do presente estudo, destaca-se a determinação da variação nucleotídica no domínio central do gene *iap* de *L. monocytogenes* isolados de alimentos no estado do RS. Especificamente, o trabalho visa caracterizar, pelo seqüenciamento do DNA, a existência de mutações do tipo substituição, inserção e/ou deleção, além da variação no número de aminoácidos asparagina e treonina presentes nas seqüências repetidas do domínio central do gene *iap* de *L. monocytogenes*.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Running head: Nucleotide variation among *Listeria monocytogenes* isolated from foods

Molecular Analysis of the *iap* and *hly* genes of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products

Jozi Fagundes de Mello¹, Ana Paula Guedes Frazzon², Marisa da Costa², Jeverson Frazzon³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Biotecnologia, UFRGS;

²Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS;

³Departamento de Ciência dos Alimentos, Centro de Biotecnologia, UFRGS.

*Correspondence and reprints:

jeverson.frazzon@ufrgs.br

phone: +5551 3308 6072

fax: +5551 3308 7309

Running title: Comparison of nucleotide sequences of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes*

Keywords: *Listeria monocytogenes*; *iap* and *hly* genes; raw and processed foods, threonine and asparagine.

Abstract

The bacterium *Listeria monocytogenes* is recognized as an important human pathogen being omnipresent in the environment and is responsible for contamination in raw and processed foods. The mechanism of pathogenicity is established by presence of some genes on chromosome of bacteria between them, *iap* and *hly* genes that are essential to the invasion mechanism and hemolytic activity of microorganism, respectively. The aim of present study was confirm the strain *L. monocytogenes* using PCR to *hly* gene and analysis the nucleotide variability of central domain of *iap* gene characterized by the presence of repeated sequences of threonine and asparagine amino acids. Twenty-six strains previously isolated from dairy products and classified by classic methods to *L. monocytogenes* were positive to specie-specific PCR and than submitted to nucleotide sequence determination. The results showed a sequence variation containing nucleotide substitutions, insertions, deletions and a number of repeated sequences among the isolates and control strain EGD-e. Twenty-three strains exhibited the same gap that includes a deletion of 24 base pairs inside of the repeated sequence and similar alterations in the translated protein. Just three strains showed different sizes of gaps and protein alterations. According to these results, the majority strains displayed a common molecular characteristic different from the strain pattern and this predominant profile can be considerate as characteristic to *L. monocytogenes* isolated from dairy products in South Brazil.

Introduction

The genus *Listeria* comprises a group of Gram-positive bacteria, which includes six different species that are ubiquitous in nature and can be found in plants, silage, soil, decaying vegetables, water and asymptomatic human or animal carriers (Hain, et al. 2006; Volokhov, et al. 2002). Between them, *Listeria monocytogenes* is recognized as an important foodborne pathogen responsible to cause the listeriosis, an important disease that show harsh complications like septicemia, meningitis, encephalitis, spontaneous abortion, stillbirth, and other infections of the central nervous system (Gandhi & Chikindas, 2007).

All species of *Listeria* sp. are characterized by seventeen serovars and *L. monocytogenes* have thirteen them (JAY, 2005). Among these, the serovars 1/2a, 1/2b and 4b are related to mostly infection caused by this bacterium (Zhou & Jiao, 2004). The virulence of bacteria depends on its capability of invading and multiplying in professional phagocytes as well as in nonprofessional host cells (Pilgrim, et al. 2003). The *hly* gene has an important role in the intracellular parasitism due to the production of Listeriolysin O (LLO). LLO is a pore-forming exotoxin that has hemolytic activity, which is essential for the bacterium to escape from the primary and secondary phagocytic vesicle of the macrophage (Schuerch, et al. 2005; Dubail, et al. 2000). The *iap* gene in turn encodes the protein p60 that has been associated with invasion of nonprofessional phagocytic cells and acts as a murein hydrolase, essential for cell division (Bubert, et al. 1997). The central domain of p60 in *L. monocytogenes* is recognized to be different from other species and is characterized by the presence of repeated sequences of threonine and asparagine amino acids (Rodríguez-Lázaro, et al. 2004; Pilgrim, et al. 2003). Thus, *iap*

gene can be useful to determine the molecular variation between *L. monocytogenes* and others *Listeria* species (Köhler, 1990).

The aim of the present study was to trace of genotypic profile among *L. monocytogenes* isolated from dairy products in South Brazil using the nucleotide variations of central domain of *iap* gene.

Materials and methods

Bacterial strains and DNA extraction

L. monocytogenes ATCC number 7644 was used as positive control and all other strains comes from LANAGRO/RS. Cells were stored at -70°C in buffered glycerol. In order to analyze the morphology and confirm the colony purity, cells were grown in Listeria Enrichment Broth (LEB; Acumedia) for 18 hours at 37 °C on shaker and isolated on solid media (LEB, 1,5% ágar-ágar). For DNA extraction the protocols described by Agersborg and cols (Agersborg, et al. 1997) was utilized.

Molecular characterization of Listeria sp. and L. monocytogenes

For genus *Listeria* was designed the following primers: GF (5'-GCAACTATCGCGGCTACAGC-3') and GR (5'- CCAAGTTGCGCTAACAGATTTTC-3')

using the BLAST-N tool (www.ncbi.nlm.nih.gov). For *L. monocytogenes* characterization, primers - LF and LR - previously described by Bansal, 1996, were used (Bansal, 1996). Primers, SI4AD and SI4BD, described by Saito et al. 2005, were utilized for the study of the central domain of *iap* gene (Saito, et al. 2000). All analyses of the PCR amplification were performed in final volume of 25 μ L containing 3 μ L chromosomal DNA, 1 U of *Taq polymerase* (Invitrogen) in reaction buffer (2 mM MgCl₂) and 0,2 mM of each dATP, dTTP, dCTP and dGTP. A Thermal Cycler (MJ Research, Inc. PTC-100) was utilized to PCR reaction. The cycling parameters used were initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 30 cycles, each one consisting of 1 min at 94 °C, 1 min at 45 °C and 1 min at 72 °C. A final cycle of 72 °C for 5 min was performed. PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1% agarose gel stained with ethidium bromide (0,5 μ g mL⁻¹) observed in UV transillumination and photographed using Kodak Digital Science™ DC120. Invitrogen Life Technologies – Brazil, manufactured primers used in this study.

Purification of PCR products and DNA sequencing

Purification Kit (Pure Link, Invitrogen) and Sequenciator ABI3100 (Applied Biosystem) with Kit Big Dye Terminator V.3.1. were used to performed the purification of PCR products and subsequent DNA sequencing. The public databases CLUSTAL W multiple-alignment tool (European Bioinformatics Institute, EMBL) and Molecular Toolkit (Colorado State University) were used for alignment and translation of the nucleotides, respectively.

Results and Discussion

PCR products from Listeria sp. and L. monocytogenes isolates

The *L. monocytogenes* strains (Table 1) isolates were characterized for the genus *Listeria* by amplification of N-terminal region of *iap* gene using primers GF and GR. The results revealed the same amplification pattern for all *Listeria* sp. tested in agreement with Buber et al., 1997) (Figure 1, lane 2) and no spurious DNA fragment was observed when primers were tested against chromosomal DNA of *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Bacillus circulans* and *Staphylococcus aureus* confirming your specificity (data no show). All *Listeria* sp. strains characterized were then submitted to PCR analyses using the primers species-specific LF and LR (Bansal, 1996). Results had confirmed twenty-six isolates as *L. monocytogenes* (Figure 1, lane 3).

Analysis of nucleotide sequences of Listeria monocytogenes

For this assay the nucleotide fragment was obtained by PCR using the primers SI4AD and SI4BD and displayed a single and intense band (Figure 1, lane 4). The multiple sequences obtained in this study were compared against *L. monocytogenes* EGD-e strain standard (Gen Bank access X52268) and the analysis showed nucleotide substitutions, mutations, deletions and other repeated sequences (Figure 2). Nucleotide

substitutions were found among the isolates and *L. monocytogenes* EGD-e strain in a total of 33 nucleotide different occasions. The most frequent nucleotide substitution was the substitution of adenine (A) for guanine (G), thiamine (T) for cytosine (C) and other types of substitutions of nucleic bases. According to the quantity of substitutions, the strains were divided into two groups: one group comprised 21 isolates with more than 10 positions and the other group comprises 5 isolates with less than 9 positions including strain A55 that didn't display any substitutions. Twenty-one isolates presented 12 nucleotide substitutions in common and the majority of these substitutions displayed the same nucleotide. In the region of the repeated sequence of the *iap* gene, a gap of deletion was found in almost all strains, with exception of strain A55, and according with deletions a predominant profile included twenty-three strains displaying a gap of 24 nucleotides, one strain (A54) showed a gap of 18 nucleotides and, one strain A46 showed a gap of 6 nucleotides. Further, three substitution patterns of nucleic acids were observed in 21 from the 26 strains in positions 1450 (A → G); 1478 (T → A) and 1484 (A → T), resulted in alteration of amino acids asparagine, serine and threonine by amino acids serine, threonine and serine on protein p60, respectively. Others mutations were observed in other regions of translated protein but they had not configured a standard, resulting only in prompt changes (Figure 3).

The whole analysis suggested that the same strains are present in Rio Grande do Sul State and displayed a variety of substitutions and deletions in the *iap* gene probably resulting from the adaptation of the environment, stress response or another kind of genetic adaptations. These results suggested a molecular profile of *L. monocytogenes* in the South Brazil. The investigation of the *iap* region may contribute for the epidemiology, geographical and molecular knowledge about this important human

pathogen. Further investigations would be necessary to amplify the understanding of the infection route and those virulent mechanisms of *L. monocytogenes*.

Acknowledgments

We are grateful to LANAGRO/RS for providing the strains of *Listeria* sp. and ACTGene laboratories by sequencing facilities. J.F. (CNPq, 306397/2006-4) is research awardees from the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil and J.M. is a Master Degree fellow from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

Agersborg, A., R. Dahl and I. Martinez. 1997. Sample preparation and SNA extraction procedures for polymerase chain reaction identification of *Listeria monocytogenes* in seafoods. *International Journal of Food Microbiology* 35: 275 – 280.

Bansal, N.S. 1996. Development of a polymerase chains reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Letters in Applied Microbiology* 22: 353-356.

Bubert, A., et al. 1997. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti-p60 antibodies an/or PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 35:179 – 183.

CLUSTAL W – Nucleotide Sequence Database - European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Dubail, I., et al. 2000. Listeriolysin O as a receptor to identify constitutive and in vivo-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 68: 3242 – 3250.

Gandhi, M., and M. L. Chikindas. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*.113: 1 – 15.

Hain, T., C. Steinweg, and T. Chakraborty. 2006. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. *Journal of Biotechnology* 126: 37-51.

JAY, J., M. 2005. *Microbiologia de Alimentos*. 6th.ed. p. 518 – 542.

Köhler, S. 1990. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes* and its use as a specific probe for *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 58: 1943 – 1950.

Molecular Toolkit - Colorado State University;

<http://www.vivo.colostate.edu/molkit/index.html>

NCBI-N Tool - National Center for Biotechnology Information; www.ncbi.nlm.nih.gov

Pilgrim, S. et al. 2003. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infection and Immunity* 71: 3471 – 3484.

Rodríguez-Lázaro, D., et al. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02482* targets and amplifluor technology. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3): 1366 – 1377.

Saito, A., Sawada, T., Ueda, F., Hondo, R. 2000. Characterization of *iap* gene in *Listeria monocytogenes* strains isolated in Japan. *Microbiologica* 23: 159 – 165.

Schuerch, D. W., E.M. Wilson-Kubalek and R.K Tweten. 2005. Molecular basis if listeriolysin O pH dependence. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0500558102.

Volokhov, D., et al. 2002. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 4720 – 4728.

Zhou, X. and X., Jiao. 2004. Molecular grouping and pathogenic analysis of *Listeria monocytogenes* of clinical and food origin. *Food Control* 16: 867 – 872.

Figure legends

Figure 1 - PCR characterization of *iap* and *hly* genes of *Listeria monocytogenes*. Lane 1- Molecular weight marker (100bp); 2- Product of PCR amplification using primers GF and GR; 3- Product of PCR amplification using primer LR and LF describe by Bansal, 1996; 4- Product of PCR amplification using primers SI4AD and SI4BD describe by Ueda, 2005.

Figure 2 - The nucleotide sequences for *iap* gene in *Listeria monocytogenes* isolates. EGD-e- positive pattern *L. monocytogenes*. Nucleotides identical to those positive control are indicated as asterisks; gap are indicates as hyphen and the letters denote the substitution of nucleotide.

Figure 3 - Translation for amino acids sequences for *iap* gene in *Listeria monocytogenes* isolates. EGD-e- positive pattern *L. monocytogenes*. Amino acids identical to those positive control are indicated as asterisks; gap are indicates as hyphen and the letters denote the substitution of amino acid.

Tables

TABLE 1. *Listeria monocytogenes* strains used in the study.

Serovar	Quantity	Source
1b	09	LANAGRO ^a
4b	09	LANAGRO ^a
1c	02	LANAGRO ^a
4c	01	LANAGRO ^a
1/2 a	02	LANAGRO ^a
1/2 b	03	ICBS -UFRGS ^b

^a- Agropecuary National Laboratory in Porto Alegre – Brazilian Department of Agriculture.

^b- Institute of Basic Sciences – Federal University of Rio Grande do Sul State.

Figures

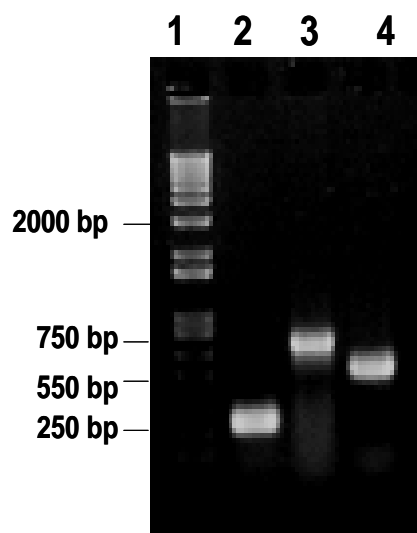


Figure 1

1356 | 1406 | 1431 | 1461

EGD-e CCAGCTCCTGCACCATCTACAAACACAAATGCTAATAAAACAAATACAAATACAAATACAAATACAAATACAAACAATACTAATAACAAATACACCATCTAAA

1b.A32 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A33 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A34 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A35 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A36 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A37 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A39 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A38 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1b.A69 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A40 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A42 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A47 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A49 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A50 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A43 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A44 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A48 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4b.A70 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1c.A45 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

1c.A65 *****C*****G*****G*****-----*****G*****

4c.A46 *****C*****G*****G*****G*****G*****-----*****G*****

1/2a.A54 *****G*****T*****-----*****

1/2a.A55 *****G*****C*A-----*****

1/2b.a11 *****G*****C*A-----*****

1/2b.a5 *****G*****C*A-----*****

1/2b.a20 *****G*****C*-----*****T*****

1464 | 1505 | 1561

EGD-e AATACTAATACAAACCTCAAATACTAATACGAATACAAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTCTTCCAACAATAACAGCAATTCAAGTGCAAGTGCT

1b.A32 *****C*****T**TA***CT*C*****G*****A

1b.A33 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

1b.A34 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

1b.A35 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

1b.A36 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

1b.A37 *****C*****T**TA***CT*C*****T**A*G***CA*****G*****

1b.A39 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

1b.A38 *****C*****T**T***CT*C*****T*****G*****

1b.A69 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A40 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A42 *****C*****T**TA***C**C***A*****T*****T*****AC*****

4b.A47 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A49 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A50 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A43 *****C*****T**TA***T*C*****T*****G*****

4b.A44 *****C*****T**TA***T*C*****T*****G*****

4b.A48 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

4b.A70 *****C*****T**TA***CT*C*****T*****G*****

```
1464                               1505                               1561
EGD-e  AATACTAATACAAACTCAAATACTAATACGAATACAAACTCAAATACGAATGCTAATCAAGGTTCTTCCAACAATAACAGCAATTC AAGTGCAAGTGCT
1c.A45 *****C*****T**TA****CT*C*****T*****G*****
1c.A6  *****C*****T**TA****CT*C*****T*****
4c.A46 *****C*****T**TA****CT*C*****T*****
1/2a.A54 *****
1/2a.A55 *****
1/2b.a11 *****C*****T*****C*****
1/2b.a5 *****C*****T*****C*****
1/2b.a20 *****T*****C*****T*****G*****C*****
```

Figure 2

3 DISCUSSÃO GERAL

3.1 Caracterização do gênero *Listeria* pelo uso do gene *iap*

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados para a caracterização do gênero *Listeria* sp. foi baseado na seqüência nucleotídica do gene *iap* na região 5' iniciadora e foram denominados: GF 5' GCA ACT ATC GCG GCT ACA GCT 3' e GR 5' CCA AGT TGC GCT AAC AGA TTT 3'. Todos os microrganismos previamente caracterizados bioquimicamente e utilizados neste trabalho foram submetidos à PCR para a confirmação do gênero *Listeria* sp. O padrão de bandas resultante da amplificação do DNA é mostrado na Figura 4. O tamanho estimado do fragmento de amplificação era de aproximadamente 250 pares de base e se apresentou de acordo com o esperado, pois corresponde à seqüência nucleotídica que delimita a região de amplificação. Os resultados obtidos com esse ensaio vêm ao encontro dos publicados por Bubert et al. (1992, 1999), que também utilizaram a região inicial do gene *iap* para detectar a presença do microrganismo *Listeria* sp. usando as técnicas de PCR e PCR Multiplex. A eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores para a caracterização de *Listeria* sp. foi evidenciada a partir dos resultados obtidos, onde todas as cepas analisadas neste estudo apresentaram o padrão de amplificação de acordo com o esperado, comprovando que as amostras analisadas realmente pertencem ao gênero *Listeria* sp.

A especificidade dos primers utilizados é mostrada na Figura 5. Os oligonucleotídeos iniciadores desenhados para a caracterização molecular de *Listeria* sp. mostraram-se bastante específico para o gênero *Listeria*, uma vez que estes foram testados com microrganismos de variados gêneros. O gênero *Salmonella*, por exemplo, representado pela espécie *Salmonella enteritidis*, foi escolhido por apresentar em torno de 38 a 65% de genes homólogos, além de agrupamentos de genes ortólogos com *Listeria* sp. Esses agrupamentos de genes são responsáveis pela hidrólise da etanolamina e do propanodiol, utilizados para síntese de vitamina B₁₂, que serve como

fonte de energia para seu desenvolvimento (BUCHRIESER et al., 2003). O gênero *Bacillus*, representado pelo *Bacillus circulans*, foi escolhido por apresentar genes homólogos com *Listeria* sp. A análise dos genomas de *Listeria* e *Bacillus subtilis* sugere uma origem em comum para estes microrganismos ((ABEE; SCHAIK; SIEZEN, 2004). Os outros microrganismos testados, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, foram escolhidos por sua grande prevalência em alimentos (LIU et al., 2005; ZAFFARI, 2005). Após os ensaios realizados, foi confirmada a eficiência dos primers para a realização da caracterização molecular do gênero *Listeria* sp., uma vez que bandas espúrias de DNA não foram observadas em gel de agarose para todos os demais microrganismos analisados.

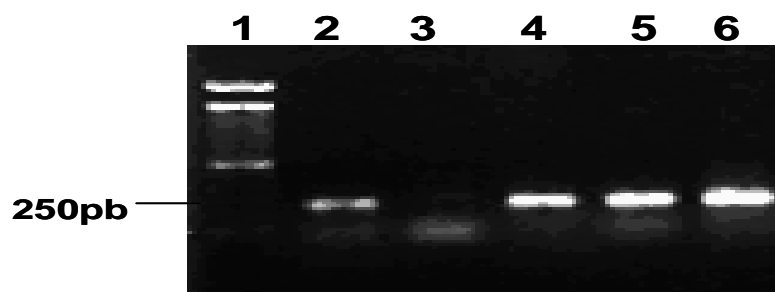


Figura 4 - Caracterização molecular de *Listeria* sp. pela amplificação do gene *iap* utilizando os primers GF e GR. Eletroforese em gel de agarose 1%.

1– Marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de base); 2– controle positivo (ATCC 7644); 3– controle negativo (sem DNA); 4– *Listeria seeligeri*; 5– *Listeria innocua*; 6– *Listeria monocytogenes*.

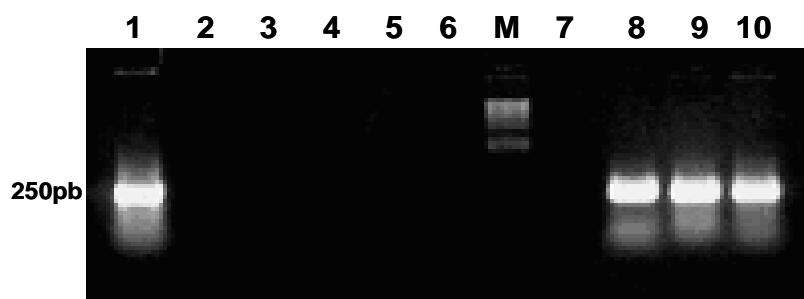


Figura 5 - Análise da especificidade dos primers GF e GR utilizado na amplificação de diversos gêneros microbianos. Eletroforese em gel de agarose 1%.

1- Controle positivo (ATCC 7644); 2- *Salmonella enteritidis*; 3- *Bacillus circulans*; 4- *Escherichia coli*; 5 - *Staphylococcus aureus*; 6- *Enterococcus faecium*; M- marcador de peso molecular (Ladder 100 pares de base); 7- controle negativo (sem DNA); 8- *Listeria seeligeri*; 9- *Listeria monocytogenes*; 10- *Listeria innocua*.

3.2 Caracterização da espécie *L. monocytogenes* pelo uso do gene *hly*

A caracterização da espécie *L. monocytogenes* através da PCR, utilizando o gene *hly*, mostrou-se eficiente, conforme demonstrado na Figura 6. Os oligonucleotídeos iniciadores, LF e LR, utilizados para esta caracterização amplificam uma região central do gene *hly* e foram descritos por Bansal (1996). O gene *hly* se caracteriza por estar presente especificamente nos isolados virulentos do gênero *Listeria*. O resultado obtido pelo presente estudo mostrou-se semelhante ao encontrado por Bansal (1996), que utilizou a mesma seqüência de oligonucleotídeos iniciadores para a detecção de *L. monocytogenes* em alimentos. A análise utilizando o gene *hly* foi realizada, com o intuito de caracterizar as amostras de *L. monocytogenes* que haviam sido previamente isoladas por técnicas de microbiologia clássica e caracterizadas por testes bioquímicos e sorologia. Essa etapa de amplificação do gene *hly* serviu para confirmação da identificação bioquímica de todas as cepas de *L. monocytogenes* utilizadas nesta pesquisa. Nesta etapa de caracterização molecular dos isolados, foram obtidos resultados que justificaram a utilização do gene *hly*. Três cepas, que haviam

sido caracterizadas bioquimicamente como pertencentes à espécie não-patógena *L. seeligeri*, apresentaram resultado molecular positivo, isto é, amplificaram o gene *hly*. Este resultado permitiu classificá-las como a espécie virulenta *L. monocytogenes* (amostras 5, 6 e 7 da Figura 6). Os testes bioquímicos para diferenciação entre as espécies *L. seeligeri* e *L. monocytogenes* contemplam apenas diferenças na fermentação de poucos açúcares, como pode ser visto na Tabela 1. Esta diferenciação entre as espécies pode gerar erros devido à sutileza da interpretação dos resultados. Analisando os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que o uso de técnicas clássicas de isolamento associadas a técnicas moleculares de caracterização em pesquisas na área de microbiologia se mostra importante e eficiente.

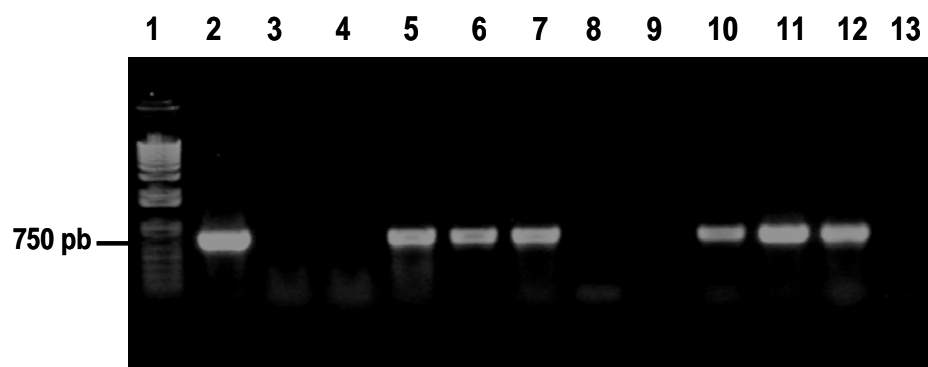


Figura 6 - Caracterização molecular da espécie *Listeria monocytogenes* pelo uso dos primers LF e LR correspondentes ao gene *hly*. Eletroforese em gel de agarose 1%.

1– marcador de peso molecular (100 pares de base); 2– controle positivo (ATCC 7644); 3 e 4 – *Listeria innocua*; 5,6 e 7– *Listeria monocytogenes* (previamente caracterizadas como *Listeria seeligeri*); 8 e 9– *Listeria seeligeri*; 10, 11 e 12– *L. monocytogenes*; 13 – controle negativo (sem DNA).

3.3 Amplificação da região central do gene *iap* de *L. monocytogenes*

Após a confirmação molecular dos isolados de *L. monocytogenes*, pelo uso do gene *hly*, estes isolados foram submetidos à amplificação, por PCR, de uma região central do gene *iap*, que corresponde a um fragmento de DNA de 550 pares de base (pb). Os oligonucleotídeos utilizados para amplificar esta região foram descritos por Saito et al. (2000) e denominados de SI4AD e SI4BD.

Os resultados da amplificação da região central do gene *iap* das amostras de *L. monocytogenes* previamente caracterizadas mostraram-se de acordo com o padrão esperado, como podem ser observados na Figura 7. Esta mesma análise genética foi realizada por pesquisadores, em Portugal, para amostras de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos (CABRITA et al., 2004).

As regiões do gene *iap* amplificadas por PCR através do uso dos oligonucleotídeos SI4AD e SI4BD, foram levadas à etapa de seqüenciamento de bases nucleotídicas.

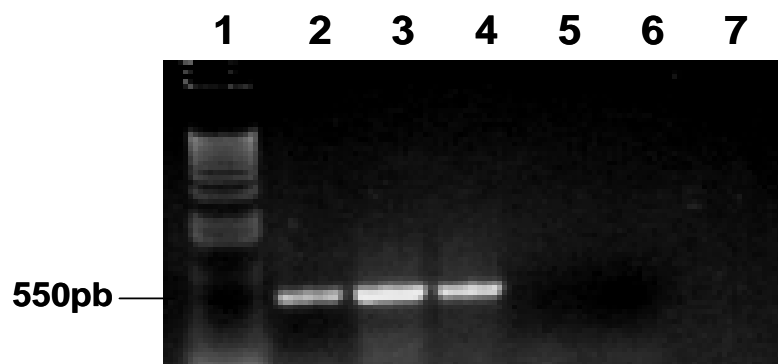


Figura 7 - Amplificação da região central do gene *iap* pelo uso dos primers SI4AD e SI4BD

1– Marcador de peso molecular (100 pares de base); 2– controle positivo (ATCC 7644); 3 e 4 – *Listeria monocytogenes*; 5– *Listeria innocua*; 6– *Listeria seeligeri*; 7- controle negativo (sem DNA).

3.4 Análise da seqüência nucleotídica da região central do gene *iap*

Vinte e seis cepas de *L. monocytogenes* foram amplificadas utilizando-se os primers SI4AD e SI4BD. A região amplificada de aproximadamente 550 pb corresponde à região central do gene *iap* e caracteriza-se pela presença de seqüências repetidas de ACA e AAT, que correspondem aos aminoácidos treonina e asparagina, respectivamente. A investigação teve como objetivo averiguar a presença de mutações silenciosas, inserções e deleções nucleotídicas, além de relacionar as implicações destas alterações nucleotídicas com possíveis alterações no conteúdo dos aminoácidos correspondentes à proteína p60. As amostras analisadas foram distribuídas em seis sorovares previamente caracterizados pela FIOCRUZ. Como padrão, foi utilizada a seqüência da cepa EGD-e, publicada pelo Instituto Pasteur no Banco de dados do “Gen Bank” com o número de acesso X52268.

Cepas pertencentes aos sorovares 1b, 4b e 1c mostraram-se bastante semelhantes entre si, apresentando, em relação à cepa padrão, deleções (gap) de 24 pares de bases, que correspondem a oito aminoácidos (quatro treoninas e quatro asparaginas). Algumas mutações silenciosas e outras pontuais resultaram em alterações na composição de aminoácidos da proteína p60, e, por sua vez, estas alterações se mantiveram bastante conservadas nos sorovares referidos acima.

As duas cepas pertencentes ao sorovar 1/2a mostraram-se bem distintas entre si, sendo uma delas, a amostra A55, muito semelhante à cepa padrão EGD-e, sem a presença de “gaps” e mutações. A segunda cepa, amostra A54, apresentou um “gap” de dezoito nucleotídeos que corresponde a seis aminoácidos: três treoninas e três asparaginas. Outras mutações não foram observadas nesta amostra. A cepa de sorovar 4c diferenciou-se das demais por apresentar uma “gap” de dois aminoácidos, apesar das mutações silenciosas e pontuais corresponderem na sua maioria às descritas para os sorovares 1b, 4b e 1c.

Finalmente, as cepas do sorovar 1/2b mostraram-se bastante semelhantes entre si, mas com várias diferenças em relação às demais, apesar do “gap” de oito aminoácidos ser semelhante aos sorovares 1b, 4b e 1c. As demais mutações

silenciosas estão posicionadas em regiões diferentes ao longo do fragmento de DNA analisado.

A interação com o ambiente e suas adversidades pode ser um fator que propicie essas alterações nucleotídicas. Os isolados de *Listeria* sp. utilizados neste estudo foram obtidos de diversas regiões do estado, portanto devido a diversidade geográfica dos isolados, pode-se sugerir que o perfil demonstrado pelos isolados neste estudo, representa a maneira pela qual o microrganismo encontra-se disseminado no estado, trazendo de uma forma geral o perfil molecular de parte do gene *iap* de *L. monocytogenes* presentes no Rio Grande do Sul. Esses dados são relevantes, mesmo que ainda não tenham sido constatados surtos de listeriose no RS, pois podem servir como base de conhecimento molecular das cepas do estado para um possível mapeamento gênico, talvez para utilização no rastreamento de linhagens virulentas ou simplesmente para a averiguação da microbiota presente no RS. Os resultados apresentados nesta pesquisa objetivaram ampliar os conhecimentos sobre a estrutura gênica de *L. monocytogenes* pela caracterização molecular dos microrganismos isolados de alimentos procedentes do estado do RS. A ampliação de conhecimentos moleculares também pode utilizar outros genes, agrupamentos e mecanismos de virulência através de uma grande variedade de técnicas microbiológicas e moleculares que contribuem para o mapeamento genético de microrganismos, como PFGE, RAPD e REA. Assim, há um amplo campo de pesquisas a ser desenvolvido para elucidar ainda mais os conhecimentos moleculares e filogenéticos deste importante patógeno humano. Dando segmento a este estudo, ainda são necessárias inúmeras outras pesquisas para a melhor compreensão dos mecanismos virulentos e para a melhora de conhecimentos sobre metabolismo bacteriano, fatores intrínsecos e extrínsecos que influenciam no desenvolvimento deste patógeno. Futuros estudos também podem avaliar a possível utilização deste microrganismo em processos biotecnológicos, como para indústria farmacêutica e alimentícia.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEE, T.; SCHAİK, W.; SIEZEN, R. Impact of genomic on microbial food safety. **Trends in Biotechnology**, London, v. 22, n. 12, p. 653-660, 2004.

ARAÚJO, P.C.C. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos de carne de peru comercializados na cidade de Niteóri-RJ-Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 30, n. 1, p. 19-25, 2002.

BAHK, J.; MARTH, E. H. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: CLIVER, O.D. (Ed.). **Foodborne Disease**. San Diego: Academic Press, 1990. Cap. 18, p. 247-257.

BANSAL, N.S. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 22, p. 353-356, 1996.

BILLE, J.; ROCOURT, J.; SWAMINATHAN, B. *Listeria*, *Erysipelothrix*, and *Kurthia*. In: MURRAY, P. et al. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed. Washington: American Society for Microbiology, 1999. Cap. 22, p. 346-352.

BUBERT, A. et al. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 24, p. 8186-8171, 1992.

BUBERT, A. et al. Isolation of catalase-negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patient and their rapid identification by Anti-p60 antibodies and/or PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 1, p. 179-183, 1997.

BUBERT, A. et al. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based in Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4688-4692, 1999.

BUCHRIESER, C. et al. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. **Immunology and Medical Microbiology**, Berlin, v. 35, p. 207-213, 2003.

BYUN, S.K.; JUNG, S.C.; YOO, H.S. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 69, p. 227-235, 2001.

CABANES, D. et al. Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 5, p. 238-245, 2002.

CAPUNZO, M. et al. Food hygiene on merchant ships: the importance of food handlers training. **Food Control**, Guildford, GB, v. 16, p. 183-188, 2004.

CATÃO, R.M,R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria spp.*, Coliformes fecais e totais e *E. Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas. v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CHURCHILL, R.; LEE, H.; HALL, J.C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin Listeriolysin O in food. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 64, p. 141-170, 2006.

COSSART, P. et al. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 11, p. 3629-3636, 1989.

COSSART, P. Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, DE, v. 291, p. 401-409, 2002.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Listeriolysin O: a genuine cytolysin optimized for an intracellular parasite. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 156, n. 6, p. 943-946, 2002.

DUBAIL, I. et al. Listeriolysin O as a receptor to identify constitutive and In Vivo inducible promoters I the pathogen *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 6, p. 3242-3250, 2000.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, US, v. 58, p. 587-610, 2004.

ERMOLAEVA, S.A. Genetic mechanisms of virulence in *Listeria monocytogenes*. **Russian Journal of Genetics**, New York, v. 37, n. 3, p. 213-219, 2001.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Dairy Journal**, Barking, v. 55, p. 476-511, 1991.

FORSYTHE, S.J. Ferramentas de Gerenciamento de Segurança Alimentar. In: FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed 2000. Cap.7, p.267-303.

GALL, M.C. **Caracterização de isolados de *Listeria* spp. Através da análise do DNA ribossomal 16S**. 2001. 93f. Dissertação (mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, Washington, v. 294, p. 849-852, 2001.

HAIN, T.; STEINWEG, C.; CHAKRABORTY, T. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 126, p. 37-51, 2006.

HOFER, C.B.; MELLES, C E. A.; HOFER, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 6, p. 375-377, 1999.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; OLIVEIRA, M.A. Meningite por *Listeria monocytogenes*: relato de casos em pacientes do Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 173-177, 1998.

HOFER, E.; RIBEIRO, R.; FEITOSA, D.P. Species and sorovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. **Memórias do Instituto Adolfo Cruz**, São Paulo, v. 95, n. 5, p. 615-620, 2000.

HOFER, E.; REIS, C.M.F. Espécies e sorovares de *Listeria* isolados de animais doentes e portadores no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 2, p. 79-83, 2005.

IRETON, K.; COSSART, P. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, US, v. 31, p. 113-138, 1997.

JACQUET, C. et al. Expression of ActA, Ami, InlB and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 616-622, 2002.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

KAYAL, S.; CHARBIT, A. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, p. 514-529, 2006.

LIU, D. et al. PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 9, p. 944-948, 2005

LOW, J.C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **The Veterinary Journal**, London, v. 153, p. 9-29, 1997.

LUNGE, V. R. **Desenvolvimento de técnicas de biologia molecular para detecção e identificação de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes***. 2000. 121f. Tese (doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

MCLAUCHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 15-33, 2004.

MENGAUD, J. et al. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the Listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 4, p. 766-772, 1988.

OTEO, J.; ALÓS, J.I. ***Listeria* y Listeriosis**. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 1997. Disponível em: < http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm >. Acesso em: 10 jan. 2007.

PILGRIM, S. et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. **Infection and Immunity**. Washington, v. 71, n. 6, p. 3473-3484, 2003.

REISSBRODT, R. New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp. – an overview. **International Journal of Food Microbiology**., Amsterdam, v.95, p. 1-9, 2004.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D., et al. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02482* targets and amplifluor technology. **Applied and Environmental Microbiology** 70 (3): 1366 – 1377.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, Guildford, GB, v.7, n.4/5, p.195-202, 1996.

SAITO, A., SAWADA, T., UEDA, F., HONDO, R. 2000. Characterization of *iap* gene in *Listeria monocytogenes* strains isolated in Japan. **Microbiologica** 23: 159 – 165.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria* Pirie. 1940, 383AL. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.). **Bergey's manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, c1986. v. 2, section 14, p. 1235-1245.

SCHMID, M.W. et al. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 28, p.1-18, 2005.

SCHUERCH, D. W.; WILSON-KUBALEC, E.M.; TWETEN, R.K. Molecular basis of Listeriolysin O pH dependence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, Washington, v. 102, n. 35, p. 12537-12542, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Detecção de *Listeria monocytogenes*. In: SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela. 1997. Cap. 17, p.133-139.

SILVA, I.M.M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. In critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2002.

SILVA, W.P. et al. *Listeria* spp. No processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004.

TOKATLI, F.K.; CINAR, A.; SCHLESSER, J.E. HACCP with a multivariate process monitoring and fault diagnosis techniques: application to a food pasteurization process. **Food Control**, Guildford, GB, v. 16, p. 411-422, 2005.

UEDA, F. et al. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 3, p. 455-467, 2005.

VÁZQUES-BOLAND, J.A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001a.

VÁZQUES-BOLAND, J.A. et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, p. 517-584, 2001b.

VOLOKHOV, D. et al. Identification of *Listeria* species by Microarray – based assay. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 12, p. 4720-4728, 2002.

ZAFFARI, C.B. **Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella* sp. em queijos produzidos artesanalmente na Região Litorânea do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2005. 86f. Dissertação (Mestrado) – Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.