

Área: Ciência de Alimentos

**ENSAIO DE CONJUGAÇÃO ENTRE *Listeria monocytogenes* Lm16 e
Enterococcus faecalis JH2-2 EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Patrícia Radatz Thiel*, Louise Haubert, Claudio Eduardo dos Santos Cruzen,
Ângela Maria Fiorentini, Wladimir Padilha da Silva**

Laboratório de Processamento de Produtos de Origem Animal e Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Curso de Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

**E-mail: patiradatz@gmail.com*

RESUMO: *Listeria monocytogenes* é um importante agente causador de doenças transmitidas por alimentos que pode exibir resistência aos antimicrobianos. A cadeia alimentar é a principal via de disseminação da resistência antimicrobiana entre diferentes bactérias, devido à presença de elementos genéticos móveis. Neste estudo, objetivou-se avaliar a transferência do gene de resistência *tetM* via plasmidial de *L. monocytogenes* Lm16, isolada de linguiça mista Frescal, para *E. faecalis* JH2-2 em queijo Minas Frescal durante o seu período de vida útil. A análise de viabilidade celular de *L. monocytogenes* e *E. faecalis* em queijo confirmou que tanto a cepa doadora quanto a receptora mantiveram-se viáveis durante todo o período de armazenamento, sob refrigeração, apresentando cinética de crescimento semelhante entre os dois micro-organismos. A cepa doadora transferiu o plasmídeo que contém o gene *tetM* o qual confere resistência à tetraciclina, a partir do segundo dia de armazenamento. O queijo Minas Frescal fornece um ambiente adequado para a transferência de plasmídeo entre a cepa doadora e receptora. Conclui-se que a cepa *L. monocytogenes* Lm16 de origem alimentar apresenta potencial de disseminação de resistência à tetraciclina em uma matriz alimentar pronto para o consumo, destacando um sério problema de saúde pública.

Palavras-chave: Transferência horizontal; Plasmídeo; Transconjugante; Queijo Minas Frescal.

1 INTRODUÇÃO

Leite e seus derivados são frequentemente implicados em surtos de infecções ou intoxicação alimentares. Vários fatores podem contribuir para a presença de alguns tipos de micro-organismos patogênicos nesses alimentos: sua origem, a maneira como foram processados, manipulação, transporte e armazenamento que, de maneira isolada ou em conjunto, favorecem o desenvolvimento de micro-organismos causadores de doenças (GARCIA-CRUZ, 1994; MOURA, 1993; SILVA, 1998).

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo frequente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a

partir de leite cru, não sofrerem processos de maturação e consumidos sem cocção. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (FEITOSA, et al, 2003).

Listeria monocytogenes é o único patógeno humano importante entre as 17 espécies atualmente reconhecidas dentro do gênero *Listeria*, embora *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. ivanovii* ocasionalmente, foram associados com doença humana (WELLER et al., 2015). *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase positiva, oxidase-negativa e não-esporulada. A temperatura ótima para a multiplicação desse micro-organismo está situada ente 30 e 37 °C (ROWAN & ANDERSON, 1998). Não obstante, este patógeno também pode se multiplicar em temperaturas de refrigeração (4 - 10 °C). Além disso, este micro-organismo tolera altas concentrações de sal (até 10%) e uma ampla faixa de pH (4,6 – 9.0), fazendo com que *L. monocytogenes* seja considerado um perigo biológico em alimentos, haja vista sua capacidade em persistir sob condições adversas no ambiente de processamento de alimentos (BUCHANAN et al., 2017; CONFICONI et al., 2016; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Destaca-se que o leite cru e pasteurizado, bem como, queijos macios já foram associados a uma série de surtos de listeriose (ADAMS, 2008).

O perfil de resistência para tetraciclina é o fenótipo de resistência mais detectado entre isolados de *L. monocytogenes* de origem alimentar e pode ser conferido pelos genes *tet* (*tetM*, *tetO* e *tetS*), envolvendo proteínas de proteção do ribossomo que impedem a ligação com o antibiótico. Outro mecanismo de resistência envolvido são bombas de efluxo, que exportam o antibiótico para o meio extracelular, e são codificadas pelos genes *tetA*, *tetB*, *tetK* e *tetL* (RIZZOTI et al., 2009; ROBERTS, 2005).

Na Europa, os enterococos têm sido descritos ao longo da história como responsáveis pela fermentação de vários tipos de queijos artesanais (GIRAFFA, 2002), no entanto, alguns autores os descrevem como culturas potencialmente patogênicas (ORGIER; SERROR, 2008; KHAN et al., 2010). A detecção de enterococos resistentes a antimicrobianos pode ser atribuído a eficientes mecanismos de troca de material genético.

A resistência bacteriana é um problema grave de saúde pública e decorre do uso indiscriminado e/ou irracional de antimicrobianos para tratar casos de infecções em humanos e animais bem como pelo uso profilático. A resistência para a tetraciclina na maioria das bactérias é atribuída à aquisição de novos genes, geralmente associados com elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (ROBERTS, 2005).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a transferência do gene de resistência *tetM* via plasmidial de *L. monocytogenes* para *E. faecalis* em queijo Minas Frescal durante o período de vida útil do produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

O isolado *L. monocytogenes* Lm16 obtido de linguiça frescal comercial e pertencente a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia "Eliseu Maciel", Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil foi utilizado como cepa doadora nos experimentos de conjugação. A cepa *E. faecalis* (JACOB & HOBBS, 1974) foi utilizada como cepa receptora, sendo adquirida no Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

2.2 Produção da matriz alimentar

O queijo Minas Frescal foi produzido com 5 litros de leite integral pasteurizado (Santa Clara®, Carlos Barbosa, Brasil). O leite foi aquecido a 37 °C e adicionou-se 0,5% (p / v) de cloreto de sódio (NaCl, Synth®, Diadema, Brasil), cloreto de cálcio a 0,2% (p / v) (CaCl₂, Synth®, Diadema, Brasil) para obter uma concentração de 200 mg.kg⁻¹ de cálcio iônico e 0,7 mL.L⁻¹ de coalho (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda, Valinhos, Brasil), seguida de inoculação das cepas doadoras e receptoras (10⁷ UFC.g⁻¹). Após uma hora, a coalhada foi removida e o queijo foi transferido para recipientes de plásticos, para armazenamento a 4 °C durante 21 dias. Como controle negativo (C1) do experimento, o queijo Minas Frescal foi produzido da mesma maneira sem adição das cepas. Os queijos foram amostrados em duplicada, imediatamente, após a produção e nos dias 2, 7, 14 e 21.

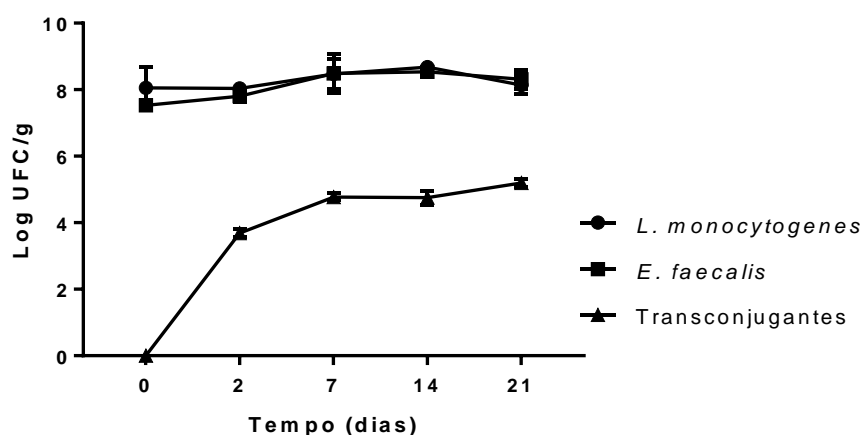
2.3 Análises microbiológicas

No tratamento (T1), foram adicionados as cepas *L. monocytogenes* Lm16 e *E. faecalis* JH2-2. As análises microbiológicas foram realizadas para verificar a concentração celular das cepas doadora, receptora e transconjugantes durante todo o período de validade dos queijos. No controle negativo (C1), a análise foi realizada para comprovar a ausência de *L. monocytogenes* e *E. faecalis* no queijo Minas Frescal. Para isso, foram avaliados 10 g das amostras (T1 e C1) em cada dia de amostragem (0, 2, 7, 14 e 21). As amostras foram diluídas em 90 mL de água peptona tamponada (BPW, Oxoid, Hampshire, Reino Unido), homogeneizadas em *stomacher*. Para a análise de *L. monocytogenes*, a amostra foi incubada a 20 °C durante 1 h. Diluições decimais foram realizadas e alíquotas foram inoculadas em ágar cromogênio (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), suplementado com 20 µg.mL⁻¹ de tetraciclina e incubado a 37 °C por 48h. A análise de *E. faecalis* foi realizada em caldo *Streptococcus faecalis* (SF, Himedia, Mumbai, Índia) com adição de 2% (p / v) de Ágar bacteriológico (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), suplementado com 20 µg.mL⁻¹ de rifampicina com incubação das placas a 37 °C por 48 h. Para a contagem de células transconjugantes, diluições seriadas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar de Triptona de soja (TSA, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) suplementada com 20 µg.mL⁻¹ de tetraciclina e 20 µg.mL⁻¹ de rifampicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) com incubação a 37 °C por pelo menos 48 h.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises microbiológicas, observam-se a viabilidade das cepas doadora e receptora e também a presença de células tranconjugantes a partir do segundo dia de armazenamento sob refrigeração no tratamento (T1), conforme a Figura 1. No controle negativo (C1), não foi observada a presença de *L. monocytogenes* e *E. faecalis*.

Figura 1: Viabilidade das cepas doadora, receptora e transconjugantes.



A contagem da cepa doadora foi de 10^8 UFC.g⁻¹ no período avaliado (0 a 21 dias). Enquanto que para a cepa receptora, sua concentração foi de 10^7 UFC.g⁻¹, aumentando para 10^8 UFC.g⁻¹ no 7º dia, permanecendo-se até o dia 21. A viabilidade das cepas doadora e receptora na matriz alimentar detectadas durante os 21 dias apresentam riscos à saúde pública, pois o queijo Minas Frescal é um alimento pronto para consumo. Em outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, Dannenberg, Funck, Mattei, Silva & Fiorentini (2016) prepararam queijo frescal do tipo Minas com a adição da cepa de *L. monocytogenes* ATCC® 7644, na qual a contagem desse patógeno aumentou de 10^4 para 10^7 UFC.g⁻¹ durante os 30 dias de refrigeração (4 °C), demonstrando um aumento na viabilidade durante o prazo de validade do alimento e, portanto, um risco para a saúde pública.

A contagem do transconjugantes no período avaliado variou de 10^3 UFCg⁻¹ para 10^5 UFC g⁻¹, se mantendo na matriz alimentar durante todo o período de armazenamento. Semelhante experimento avaliou ensaios de conjugação na superfície de queijo semi-maduro e salmão defumado, e observaram a transferibilidade do gene *tetM* entre cepas de *L. monocytogenes* (BERTSCH et al., 2013)

Cocconcelli et al. (2003) avaliaram a taxa de crescimento de cepas dos enterococos (doador e receptor) em um modelo alimentar de queijo em um período de 8 dias sob armazenamento a 10 °C. A cepa doadora alcançou uma concentração celular de 10^4 , 10^5 e 10^6 UFC.g⁻¹, enquanto que a cepa receptora atingiu 10^4 , 10^5 e 10^7 UFC.g⁻¹ nos dias 0, 2 e 7, demonstrando valores menores que em nosso estudo.

Segundo Cocconcelli et al. (2003), existe pouca informação sobre a difusão de enterococos virulentos e resistentes a antibióticos em alimentos, onde estes micro-organismos compreendem uma parte relevante da comunidade microbiana, atingindo altas contagens celulares em alimentos prontos para consumo. Além disso, poucos dados estão disponíveis sobre o efeito dos alimentos na ocorrência de transferência horizontal de genes de resistência.

4 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que houve transferência do gene de resistência *tetM* de *L. monocytogenes*, isolada de linguiça mista frescal, para *E. faecalis* na matriz alimentar (queijo Minas Frescal). A transferência horizontal ocorreu com alta frequência durante a vida útil do produto, mesmo sob armazenamento a

4 °C. Destaca-se que o isolado *L. monocytogenes* Lm16 de origem alimentar apresenta potencial de disseminação de resistência à tetraciclina, considerado um problema de saúde pública.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES pelas bolsas de estudos concedidas, à FAPERGS pela bolsa de iniciação científica concedida, a Professora Dra. Ana Lucia da Costa Darini da Universidade de São Paulo pelo fornecimento da cepa *E. faecalis* JH2-2 e a professora Dra. Gladis Aver Ribeiro da Universidade Federal de Pelotas pelo fornecimento do caldo SF.

6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.R.; MOSS, M.O. **Food microbiology**. 3. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 2008, p. 224-231.
- BERTSCH, D., URUTY, A., ANDEREGG, J., LACROIX, C., PERRETEN, V., & MEILE, L.. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfrG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, p. 986–991.
- BUCHANAN, R.L.; GORRIS, L.G.M.; HAYMAN, M.M.; JACKSON, T.C. & WHITING, R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 2017 p. 1–13.
- COCCONCELLI, P.S.; CATTIVELLI, D. & GAZZOLA, S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 2003 p. 315–323.
- CONFICONI, D.; LOSASSO, C.; CORTINI, E.; DI CESARE, A.; CIBIN, V.; GIACCONE, V.; CORNO, G. & RICCI, A. Resistance to biocides in *Listeria monocytogenes* collected in meat-processing environments. *Frontiers in Microbiology*, 2016 p. 1–9.
- DANNENBERG, G da S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P. da; & FIORENTINI, A. M.; Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2016, p. 120–127.
- FEITOSA, Terezinha; et al. **Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte**, *Ciênc. Tecnol. Aliment.*[online]. 2003, vol.23, pp.162-165
- GABIN-GAUTHIER, K; FRATADOUX, J. J.; & RICHARD, J. Conjugal plasmid transfer between lactococci on solid surface matings and during cheese making. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, p. 133–140.
- GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163- 171, 2002.
- GARCIA-CRUZ, CH.; HOFFMAN, F. H.; VINTURIM, T. M.; Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 1994, p. 78-82.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.-L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 1-10, 2010.

MOURA, S.M.; DESTRO, M.T.; FRANCO, B.D.G.M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, 1993, p. 229-237.

OGIER, J.C., SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal Food Microbiol.** p. 291- 301, 2008.

RIZZOTTI, L; LA GIOIA, F.; DELLAGLIO F. Molecular diversity and transferability of the tetracycline resistance gene *tet* (M), carried on Tn916-1545 family transposons, in enterococci from a total food chain. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.96, p. 43-52, 2009.

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

ROWAN, N.J. & ANDERSON, J.G. Effects of Above-Optimum Growth Temperature and Cell Morphology on Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* Cells Suspended in Bovine Milk. **Applied and Environmental Microbiology**, 1998, p. 2065–2071.

SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, 1998, p. 354-356.

SANTOS, Neusa de Queiroz. **A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar.** Texto contexto enferm., Florianópolis, v. 13, 2004 .

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., KUHN, M., BERCHE, P., CHAKRABORTY, T., DOMÍNGUEZ-BERNAL, G., GOEBEL, W., GONZÁLEZ-ZORN, B., WEHLAND, J. & KREFT, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, 2001, p. 584–640.

WELLER, D., ANDRUS, A., WIEDMANN, M. & DEN BAKKER, H.C. *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2015, p. 286–292.

WANNMACHER, Lenita. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida?** ISSN 1810-0791 vol. 1, nº 4. Brasília, março 2004.