



ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA VIRULENCIA Y LA RESISTENCIA A LA DESINFECCIÓN DE BIOPELÍCULAS DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Arevalos-Sánchez, M.M.¹, Martín, S.E.², Regalado, C.¹, Díez-González, F.³, García-Almendárez, B.¹

¹DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro 76010, ²Laboratory of Food Microbiology, Dept. of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois at Urbana-Campaign, Gregory Drive, IL, USA. ³Laboratory of Food Microbiology, Dept. Food Science, University of Minnesota, MN, USA.

Palabras clave: Neutral electrolyzed water, biofilms, *L. monocytogenes*.

Introducción. *Listeria monocytogenes* es un patógeno de transmisión por alimentos, causante de listeriosis, que tiene la tasa más alta de letalidad (24%) entre las enfermedades transmitidas por alimentos. *Listeria* forma biopelículas, que son comunidades de microorganismos adheridos a una superficie, que les permite la adaptación y persistencia en entornos de procesamiento de alimentos. Las biopelículas son más resistentes a la acción de los antimicrobianos y su eliminación de biopelículas representa un gran desafío para la industria alimentaria (1). El agua electrolizada neutra (AEN) contiene una mezcla de agentes oxidantes, incluyendo moléculas oxidantes de cloro (HOCl/CIO⁻), ozono y ClO₂ que se generan a partir de la electrólisis de una solución salina diluida (2). Varios genes están involucrados en la respuesta al estrés de *Listeria*, tales como *sod*, que codifica para la superóxido-dismutasa y *sigB*, el principal regulador de estrés, *hly*, que codifica para la listeriolisina O, principal factor de virulencia de *Listeria monocytogenes* (3). La protección de proteínas bajo estrés oxidativo está regulada por *hrcA*, un regulador de la respuesta al choque térmico de clase I y *dnaK* (4)

Metodología. Las biopelículas se cultivaron en perlas de vidrio y fueron expuestas a un tratamiento sub-letal (reducción total de 2 log UFC/mL) de AEN (75 mg/L de cloro total disponible, 3 min). Se aisló ARN de las células sobrevivientes de biopelícula, biopelícula sin tratamiento (agua desionizada) y células libres. El transcriptoma de todas las muestras de mRNA se obtuvo usando el equipo Hi-Sec 2000 (Illumina, UMN Genomic Center). Adicionalmente se seleccionaron 5 genes relacionados con la virulencia y respuesta al estrés cuyos niveles de expresión génica se determinaron utilizando PCR cuantitativo (qPCR). El método Pfaffl Delta-Delta-Ct (5) se utilizó para calcular la expresión relativa (utilizando el gen *16SrRNA* como gen normalizador).

Resultados. El estudio de secuenciación masiva de RNA identificó 999 genes regulados positivamente (cambio igual o mayor a 1.5 veces) y 10 regulados negativamente, para las muestras de biopelículas en comparación con las células libres. Los genes regulados positivamente fueron los involucrados en la virulencia, respuesta al estrés, sistemas de transporte, generación de energía, biosíntesis de la envoltura celular y homeostasis; y la percepción en *quorum*. Entre los genes que se encontraron regulados negativamente en las biopelículas fueron aquellos relacionados con la

biosíntesis del flagelo. Después del tratamiento con AEN solamente se observaron 7 genes regulados positivamente (sistemas de transporte) y 2 regulados negativamente (proteína de resistencia al choque por frío). La cuantificación de los genes seleccionados usando qPCR mostró a todos los genes estudiados regulados positivamente, el cambio en la expresión relativa fue de 2,85, 4,55, 2,51, 3,36, 4,69 veces para las biopelículas sin tratamiento y 2,44, 2,90, 3,36, 2,75, 3,43 veces para las biopelículas después del tratamiento con AEN para los genes *hly*, *sigB*, *sod*, *dnaK* y *hrcA*, respectivamente, en comparación con las expresión en células libres.

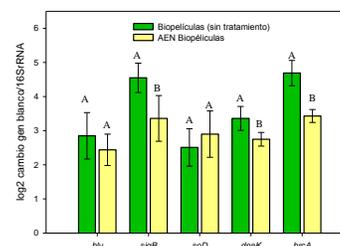


Fig. 1. Expresión relativa de los genes *hly*, *sigB*, *sod*, *dnaK* and *hrcA* en biopelículas sin tratamiento y biopelículas con tratamiento sub-letal de AEN en comparación con células libres. Los datos se normalizaron usando el gen constitutivo *16srRNA*, los resultados se expresan como log₂ del cambio.

Conclusiones. La regulación obtenida por *L. monocytogenes* debido a la formación de biopelículas no se vio afectada por efecto del tratamiento con AEN. Nuestro estudio reveló que los genes relacionados con respuesta al estrés y la virulencia tienen un papel importante en la formación de biopelículas de *Listeria* y la resistencia a la desinfección utilizando AEN.

Agradecimiento. Dr. Francisco Díez González y Dr. Ryan Fink. University of Minnesota. University of Minnesota Genomics Center

Bibliografía.

1. Chmielewski, R.A.N. y Frank, J.F. (2003). *Compr. Rev. Food Sci. Safety*. 2: 22-32.
2. Al-Haq, M. I., Sugiyama, J, y Isobe S. 2005. *Food Sci. Technol. Res. Int.* 11: 135-150.
3. Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J. y Cossart P. (2004). *Ann. Rev. Microbiol.* 58: 587-610.
4. van der Veen, S. y Abee, T. (2010). *Microbiology*. 156: 3782-3790
5. Pfaffl M. W. (2001). *Nucleic Acid Res.* 29: 2002-2007.