

ISOLAMENTO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE SUSHIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE PELOTAS-RS

TASSIANA RAMIRES¹; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS²; HELENA REISSIG SOARES VITOLA²; ADRIANA SOUTO PEREIRA NÚNCIO²; ANGELA MARIA FIORENTINI²; VLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – maryanaiglesias@hotmail.com; helena_rsv@hotmail.com; adrianaspn@hotmail.com; angefiore@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos prontos para o consumo tem aumentado significativamente no Brasil, entretanto, esses alimentos são uma importante fonte de transmissão de doenças veiculadas por alimentos (BRASIL, 2010). Assim, devido a sua popularização, a segurança desses produtos tem demandado grande atenção, especialmente em relação a sua qualidade microbiológica (YANG et al., 2015).

O sushi é um alimento pronto para o consumo, a base de pescado cru, podendo, ou não, apresentar arroz japonês e alga marinha na sua constituição. É um prato produzido manualmente, portanto bastante manipulado, cada vez mais popular na alimentação dos brasileiros (SANTOS et al., 2012). Desta forma, vários micro-organismos patogênicos importantes em alimentos, como *Listeria monocytogenes*, podem manter-se viáveis neste tipo de produto.

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, psicrotrófica e anaeróbica facultativa, patogênica para seres humanos e animais. A listeriose é uma doença decorrente da infecção por *L. monocytogenes*, que pode cursar com sintomatologia grave, podendo ser muitas vezes fatal para grupos vulneráveis, tais como idosos, gestantes, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos. Sua alta taxa de letalidade (mais de 30%) contribui para que esse micro-organismo seja considerado um importante patógeno de origem alimentar (JALALI & ABEDI, 2008).

Os antimicrobianos de escolha para o tratamento da listeriose são os β-lactâmicos, podendo ser usados em combinação com outros fármacos (KRAWCZYK-BALSKA et al., 2012). Apesar da suscetibilidade do patógeno a vários antimicrobianos, alguns isolados de *L. monocytogenes* envolvidos em surtos alimentares têm apresentado perfil de multirresistência (MARIAN et al., 2012). O surgimento e a transmissão desses isolados resistentes representa uma ameaça para a saúde humana, tendo em vista a dificuldade no tratamento da listeriose.

Frente ao exposto, o objetivo desse estudo foi verificar a presença de *L. monocytogenes* em sushis comercializados na cidade de Pelotas-RS, bem como caracterizar o perfil de resistência a antimicrobianos desses isolados.

2. METODOLOGIA

Foram realizadas quatro coletas, entre os meses de janeiro e maio de 2016. Em cada coleta foram amostrados seis sushis (arroz, alga e salmão cru) de sete diferentes estabelecimentos da cidade de Pelotas-RS. Os sushis eram obtidos de maneira aleatória e mantidos em caixas isotérmicas, até o momento do processamento das amostras, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel. A pesquisa e a enumeração de *L. monocytogenes* foram

realizadas conforme descrito na ISO 11290-1 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 1996).

A confirmação molecular dos isolados foi realizada através da *Polymerase Chain Reaction* (PCR), utilizando-se *primers* e condições previamente descritos por LIU et al. (2007), com o objetivo de amplificar uma sequência de 800 pares de bases (pb) do gene *inlA*, específico para *L. monocytogenes*.

O perfil de resistência a antimicrobianos foi verificado através da técnica de difusão em ágar, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram avaliados 14 antimicrobianos: penicilina G (10 U), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), estreptomicina (10 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (1,25/23,75 µg), sulfonamida (300 µg), trimetoprim (5 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), imipenem (10 µg), ácido nalidíxico (30 µg) e cefalotina (30 µg). Todos os antimicrobianos foram adquiridos da Laborclin®. A cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle da técnica.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

L. monocytogenes foi isolada em oito das 28 amostras de sushis analisadas, ou seja, em 28,6% das amostras havia a presença desse patógeno. Esse resultado está de acordo com VITAS, AGUADO & GARCIA-JALON (2004), os quais encontraram a presença de *L. monocytogenes* em 28% das amostras de salmão defumado prontas para o consumo. Já ATANASSOVA, REICH & KLEIN (2008), avaliaram 250 amostras de sushis, encontrando *L. monocytogenes* em três delas.

Apesar da presença de *L. monocytogenes* nos alimentos ser um risco ao consumidor, sua ocorrência em sushis é possível, tendo em vista que esse patógeno pode contaminar diversas superfícies dentro de uma planta de processamento, sendo o salmão cru, antes da filetagem, a principal fonte de introdução de *L. monocytogenes* na linha de produção (EKLUND et al., 1995). Após a contaminação da planta processadora de alimentos com *L. monocytogenes*, sua remoção é difícil, tendo em vista que essa bactéria apresenta a capacidade de formação de biofilmes (RORVIK et al., 1997). Segundo JEONG & FRANK (1994), essa capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes possibilita que *L. monocytogenes* persista em plantas de processamento de alimentos, aumentando, assim, a probabilidade de contaminações cruzadas e ambientais. Neste estudo, observou-se que no estabelecimento 1, *L. monocytogenes* foi isolada em todas as coletas, sugerindo que há uma fonte persistente de contaminação por esse micro-organismo.

Todos os oito isolados foram sensíveis à vancomicina, gentamicina, amicacina, imipenem e, inclusive, à ampicilina, que, segundo JAY (2005), é uma das drogas mais indicadas para o tratamento da listeriose. Além disso, esse mesmo autor cita a penicilina G como a droga de primeira escolha para o tratamento de listeriose, no entanto, todos os isolados obtidos neste estudo foram resistentes a esse antimicrobiano, bem como à sulfonamida, trimetoprim, ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprim. A associação sulfametoxazol-trimetoprim é a segunda escolha para o tratamento de listeriose (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999), entretanto, todos os isolados avaliados neste estudo, foram resistentes.

Além disso, dois isolados (25%) foram resistentes ao cloranfenicol, quatro isolados (50%) foram resistentes a estreptomicina e quatro apresentaram resistência à cefalotina. Todos os isolados de *L. monocytogenes* foram considerados

multirresistentes, pois apresentaram resistência a, pelo menos, três classes de antimicrobianos (NARMS, 2012).

O perfil de resistência a antimicrobianos dos oito isolados está apresentado na Figura 1.

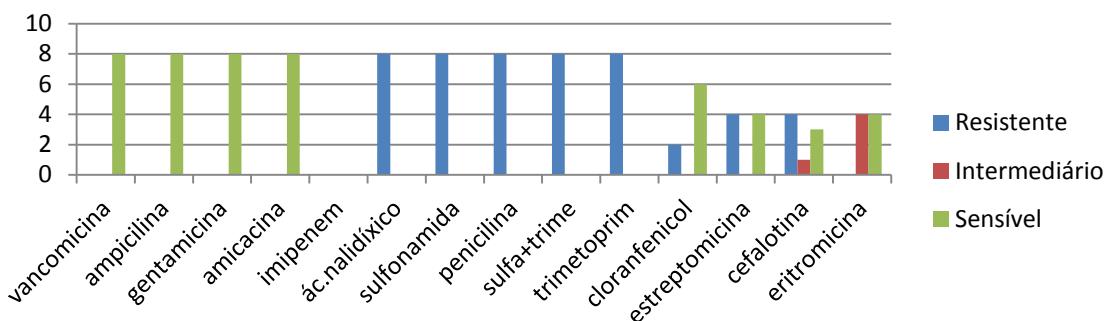


Figura 1. Perfil de resistência a antimicrobianos dos 8 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushi

O perfil fenotípico característico de *L. monocytogenes* é a fermentação de dextrose e ramnose e a atividade beta hemolítica em ágar sangue (VITAS, AGUADO & GARCIA-JALON, 2004). Neste estudo, foram observados isolados com características atípicas para essa espécie bacteriana, os quais apresentaram reação positiva também à fermentação da xilose e/ou ao manitol, porém, foram confirmados em nível molecular (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil fenotípico dos isolados de *L. monocytogenes* provenientes de sushi e confirmação molecular através do gene *inlA*

| | Fermentação de Carboidratos | | | | β -hemólise | PCR <i>inlA</i> |
|------------------------|-----------------------------|---------|---------|----------|-------------------|-----------------|
| | xilose | ramnose | manitol | dextrose | | |
| Isolado A ¹ | - | + | + | + | + | + |
| Isolado B ¹ | - | + | + | + | + | + |
| Isolado C ¹ | - | + | - | + | + | + |
| Isolado D ¹ | + | + | + | + | + | + |
| Isolado E ⁷ | - | + | - | + | + | + |
| Isolado F ⁷ | - | + | - | + | + | + |
| Isolado G ⁴ | - | + | + | + | + | + |
| Isolado H ⁶ | - | + | - | + | + | + |

- = reação negativa, + = reação positiva, ¹ = estabelecimento 1, ⁷ = estabelecimento 7,
⁴ = estabelecimento 4, ⁶ = estabelecimento 6

4. CONCLUSÃO

A presença de *L. monocytogenes* em sushis comercializados na cidade de Pelotas, RS, foi elevada, demonstrando o risco de listeriose associada ao consumo desses alimentos, em especial por imunocomprometidos. Além disso, todos os isolados foram multirresistentes a antimicrobianos, entre os quais, aqueles de escolha para o tratamento de listeriose em humanos.

5. AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATANASSOVA, V., REICH, F., KLEIN, G. Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. **Journal of Food Protection**. N. 4, p.860-864, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília, 2010.
- Charpentier E., Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.43, p.2103-2108, 1999.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2015.
- EKLUND, M. W., POYSKY, F. T., PARANJPYE, R. N., LASHBROOK, L. C., PETERSON, M. E., & PELROY, G. A. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold smoked fishery products and processing plants. **Journal of Food Protection**. V. 58, p.502-508, 1995.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Microbiology of food and animal feeding stuffs**, 1996.
- JALALI, M., & ABEDI, D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. **International Journal of Food Microbiology**. V.122, p. 336-340, 2008.
- JAY, J. M. Listerioses de origem animal. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre, Artmed, cap. 25, p. 517-542, 2005.
- JEONG, D.K.; FRANK.; J.F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 100°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v.57, p.576-586, 1994.
- KRAWCZYC-BALSKA, A., MARCHLEWICZ, J., DUDEK, D., WASIAK, K., SAMLUK, A. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. **BMC Microbiology**, v.12, p. 278, 2012.
- LIU D., LAWRENCE M.L., AUSTIN F.W., AINSWORTH A.J. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, p.133-140, 2007.
- MARIAN, M. N., SHARIFAH AMINAH, S.M., ZURAINI, M.I., SON,R., MAIMUNAH, M., LEE, H.Y. MPN-PCR detection and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from raw and ready-to-eat foods in Malasya. **Food Control**, v. 28, p. 309-314, 2012.
- NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS). **Strategic Plan 2012-2016**, 2012.
- RORVIK, L.M., SKJERVE, E., KNUDSEN, B.R., YNDESTAD, M. Risk factors for contamination of smoked salmon with *L. monocytogenes* during processing. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.37, p. 215-219, 1997.
- SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju. **Scientia Plena**. Sergipe, v. 8, n. 3, p. 1-5, 2012.
- VITAS, A.I., AGUADO, V., GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**. V.90, p. 349– 356, 2004.
- Yang, X., Huang, J., Wu, Q., Zhang, J., Liu, S., Guo, W., Cai, S., Yu, S.; Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. **Food Control**. Vol. 60, p. 50-56, 2015.