

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE CLORETO DE BENZALCÔNIO E CLORETO DE CÁDMIO EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* PROVENIENTES DE ALIMENTOS E AMBIENTES DE PRODUÇÃO

MAIARA LINDEMANN ZEHETMEYR<sup>1</sup>; LOUISE HAUBERT<sup>2</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – maiara.lz@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – louisehaubert@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – UFPel – wladimir.padilha2011@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, ubíqua, que pode ser persistente em ambiente de indústrias de processamento (RATANI et al., 2012). O patógeno *L. monocytogenes* é responsável por causar listeriose, podendo acometer tanto humanos como animais. A listeriose é uma doença principalmente transmitida através dos alimentos, relativamente rara quando comparada com outras doenças de origem alimentar, porém, considerada grave devido as altas taxas de letalidade, sendo um problema de saúde pública (DE VALK et al., 2005).

A gravidade dos sintomas pode variar de acordo com saúde do hospedeiro, e o tratamento para os sintomas clínicos da listeriose é a antibioticoterapia, sendo os β-lactâmicos, como penicilina G e ampicilina, os antibióticos de primeira escolha para o tratamento, podendo ser associados com outras classes de antimicrobianos (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 resistência, o que pode estar associado ao uso indiscriminado de antibióticos bem como à aquisição de genes de resistência (MARIAN et al., 2012).

*Listeria monocytogenes* é um micro-organismo capaz de sobreviver a condições adversas comumente encontradas na produção de alimentos (BURALL et al., 2012), assim, indústrias de alimentos mantém um rigoroso controle sobre este patógeno. Porém, os processos de limpeza e desinfecção podem ser insatisfatórios, favorecendo a ocorrência de estirpes resistentes aos produtos utilizados nestes processos, como os desinfetantes, substâncias aplicadas em superfícies abióticas, com a função de destruir os micro-organismos existentes (BRASIL, 2007; XU et al., 2016).

Há evidências de resistência cruzada entre antimicrobianos e desinfetantes em bactérias, a qual pode ser transferida para outras bactérias (FRAISE, 2002). A exposição sucessiva de *L. monocytogenes* a concentrações altas de cloreto de benzalcônio, por exemplo, resulta em mutantes com suscetibilidade reduzida para gentamicina (TO et al., 2002). Além disso, uma frequente exposição a esse agente gera uma pressão seletiva, ocorrendo resistência entre isolados de *L. monocytogenes* (KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2012). Segundo XU et al. (2014), a resistência a antimicrobianos e desinfetantes, incluindo metais pesados como cádmio, representa importante estratégia para a sobrevivência bacteriana.

Dante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de resistência ao cloreto de benzalcônio e ao cloreto de cádmio em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de produção.

## 2. METODOLOGIA

Cinquenta isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de processamento de alimentos foram selecionados da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA/FAEM/UFPel). Estes isolados foram previamente caracterizados levando em consideração os principais sorotipos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b), presença de genes das internalinas (*inlA*, *inlC*, e *inlJ*), perfil de resistência a 15 antimicrobianos, bem como de genes de resistência a antimicrobianos para a classe dos macrolídeos, tetraciclínas e aminoglicosídeos (*ereB*, *ermB*, *ermC*, *tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, Tn916-1545, *strA*, e *strB*). Cinco isolados apresentam perfil de multirresistência, e dois isolados apresentam os genes de resistência *tetM* e *ermB* (HAUBERT et al., 2015).

A concentração inibitória mínima (CIM) para o cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrech, Reino Unido) e cloreto de cádmio (Merck, Alemanha) foi determinada de acordo com MULLAPUDI et al. (2010) e KATHARIOS-LANWERMEYER et al. (2012), com algumas modificações.

Primeiramente, os isolados foram cultivados em ágar Soja Triptona (Oxoid, Reino Unido) adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura (HIMEDIA, Índia) a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, os isolados foram diluídos na concentração 2 da escala de McFarland em solução salina (Synth - Brasil) a 0,85%, e 5 µL foram adicionados sobre placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (Oxoid, Reino Unido), suplementado com 2% de sangue desfibrinado de ovinos para determinação da CIM para cloreto de benzalcônio, utilizando concentrações variáveis (0,1; 0,5; 2,5; 5; 10; 20; 35; 40; 100 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>), sob incubação a 37 °C durante 48 horas.

Para determinar a CIM para o cloreto de cádmio foi utilizado ágar *Brain Heart Infusion* (KASVI, Itália), utilizando placas de Petri com diferentes concentrações de cádmio (2,5; 5; 10; 20; 35; 70; 140 e 200 µg.mL<sup>-1</sup>) incubadas a 25 °C durante 5 dias.

A CIM para o cloreto de benzalcônio e cloreto de cádmio foi definida como sendo a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento dos micro-organismos. Os isolados foram considerados resistentes para cloreto de benzalcônio e cloreto de cádmio quando o valor da CIM foi igual ou superior a 10 e 35 µg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 50 isolados (100%) apresentaram CIM igual ou superior a 10 µg.mL<sup>-1</sup> para o cloreto de benzalcônio e igual ou superior a 35 µg.mL<sup>-1</sup> para o cloreto de cádmio, sendo considerados resistentes a esses compostos.

Os resultados obtidos neste estudo são semelhantes aos de XU et al. (2016), onde um isolado de *L. monocytogenes* (11GZL18) apresentou CIM de 28 µg.mL<sup>-1</sup> para cloreto de benzalcônio e 70 µg.mL<sup>-1</sup> para o cádmio, resultados superiores aos limites estabelecidos para considerar o micro-organismo resistente a esses compostos.

Observou-se que houve resistência cruzada entre o desinfetante cloreto de benzalcônio e o metal pesado cádmio em todos os isolados (100%), apresentando valores superiores ao estudo realizado por ZHANG et al. (2015), onde somente 65% dos isolados de *L. monocytogenes* apresentaram resistência para cádmio e 15% para o cloreto de benzalcônio.

Os resultados obtidos por XU et al. (2014) também demonstram a ocorrência de resistência cruzada, porém, em um número inferior ao deste estudo, haja vista que 14,1% dos isolados foram resistentes aos dois compostos, sendo que 26,8% foram resistentes ao cloreto de benzalcônio e 49,3% resistentes ao cádmio. Por outro lado, MULLAPUDI et al. (2008) demonstraram que o perfil de resistência para ambos os compostos é mais comum do que perfil de resistência apenas para o cádmio.

Segundo ZHANG et al. (2015), a determinação da resistência bacteriana é útil para entender e avaliar as condições de utilização dos desinfetantes, a capacidade de adaptação de *L. monocytogenes* nos ambientes de processamento de alimentos, bem como a ocorrência de resistência cruzada entre micro-organismos. A partir dessa compreensão poderiam ser desenvolvidos protocolos de desinfecção e controle de *L. monocytogenes* com maior embasamento científico (XU et al., 2016).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo são relevantes e sugerem uma relação entre resistência aos antimicrobianos, desinfetantes e metais pesados em *L. monocytogenes*. Com base nesses resultados, são necessários estudos complementares para avaliar quais são os genes envolvidos nestes perfis de resistência, bem como a verificação da presença de elementos genéticos móveis.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de iniciação científica.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14**, de 28 de fevereiro de 2007. Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06, que consta em anexo à presente Resolução. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 fev. 2007.

BURRALL, L.S.; LAKSANALAMAI, P.; DATTA, A.R. *Listeria monocytogenes* mutants with altered growth phenotypes at refrigeration temperature and high salt concentrations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p.1265-1272, 2012.

DE VALK, H.; JACQUET, C.; GOULET, V.; VAILLANT, V.; PERRA A.; SIMON, F. Surveillance of listeria infections in Europe. **Eurosurveillance**, Saint-Maurice, v. 10, p. 251-255, 2005.

FRAISE, A.P. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement**, Bedford, v. 92, p. 158S-162S, 2002.

HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G.V.; DE ITAPEMA CARDOSO, M.R.; DA SILVA, W.P. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring *tetM* and *ermB* resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, Bedford, v. 62, p. 23-29, 2015.

KATHARIOS-LANWERMEYER, S.; RAKIC-MARTINEZ, M.; ELHANAFI, D.; RATANI, S.; TIEDJE, J.M.; KATHARIOU, S. Coselection of Cadmium and Benzalkonium Chloride Resistance in Conjugative Transfers from Nonpathogenic *Listeria* spp. To Other Listeriae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 7549-7556, 2012.

KRAWCZYC-BALSKA, A., MARCHLEWICZ, J., DUDEK, D., WASIAK, K., SAMLUK, A. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator  $\beta$ -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. **BMC Microbiology**, London, v.12, p. 278, 2012.

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**, Vurrey, v. 28, p. 309-314, 2012.

MULLAPUDI, S.; SILETZKY, R.M.; KATHARIOU, S. Heavy-Metal and Benzalkonium Chloride Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from the Environment of Turkey-Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, p. 1464-1468, 2008.

MULLAPUDI, S.; SILETZKY, R.M.; KATHARIOU, S. Diverse Cadmium Resistance Determinants in *Listeria monocytogenes* Isolates from the Turkey Processing Plant Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 627-630, 2010.

RATANI, S.S.; SILETZKY, R.M.; DUTTA, V.; YILDIRIM, S.; OSBORNE, J.A.; LIN, W.; HITCHINS, A.D.; WARD, T.J.; KATHARIOU, S. Heavy Metal and Disinfectant Resistance of *Listeria monocytogenes* from Foods and Food Processing Plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 78, p. 6938-6945, 2012.

TO, M.S.; FAVRIN, S.; ROMANOVA, N.; GRIFFITHS, M.W. Post adaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 5258-5264, 2002.

XU, D.; LI, Y.; ZAHID, M.S.H.; YAMASAKI, S.; SHI, L.; LI, J.; YAN, H. Benzalkonium chloride and heavy-metal tolerance in *Listeria monocytogenes* from retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 190, p. 24-30, 2014.

XU, D.; NIE, Q.; WANG, W.; SHI, L.; YANG, H. Characterization of a transferable *bcrABC* and *cadAC* genes-harboring plasmid in *Listeria monocytogenes* strain isolated from food products of animal origin. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 217, p. 117-122, 2016.

ZHANG, H.; ZHOU, Y.; BAO, H.; ZHANG, L.; WANG, R.; ZHOU, X. Plasmid-borne cadmium resistant determinants are associated with the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to bacteriophage. **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 172, p. 1-6, 2015.