

## ***Salmonella* spp. PROVENIENTES DE ALIMENTOS E AMBIENTE DE PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS: CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME E PERFIL DE RESISTÊNCIA FENOTÍPICO E GENOTÍPICO A ANTIMICROBIANOS**

YTACYANA MARIA NASCIMENTO PEREIRA<sup>1</sup>; DARLA SILVEIRA VOLCAN MAIA<sup>2</sup>; LOUISE HAUBERT<sup>3</sup>; ISABELA SCHNEID KRONING<sup>4</sup>; GRACIELA VOLZ LOPES<sup>5</sup>; WLADIMIR PADILHA DA SILVA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de pelotas – yta\_pereira@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – darlavalcan@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

### **1. INTRODUÇÃO**

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são enfermidades de grande importância em saúde pública, causadas pela ingestão de alimentos contendo micro-organismos patogênicos ou produtos do seu metabolismo. Dentre os micro-organismos causadores de DTA, *Salmonella* spp. é um dos mais envolvidos em surtos registrados no Brasil (BRASIL, 2017).

As bactérias do gênero *Salmonella* são patogênicas tanto para humanos como para animais, podendo causar um conjunto de sinais clínicos de infecção gastrointestinal, com gravidade variável de acordo com o sorovar envolvido e a condição imunológica do hospedeiro. A salmonelose está associada, principalmente, aos alimentos de origem animal, como carnes e ovos. Na maioria dos casos, a doença é autolimitante, com sinais brandos de gastroenterite e sem a necessidade do emprego de antimicrobianos (SHINOHARA et al., 2008). Entretanto, os antimicrobianos são utilizados em quadros sistêmicos e graves, e apesar da suscetibilidade do patógeno frente a esses agentes, um número relevante de estirpes envolvidas em surtos apresentam perfil de resistência, e por vezes de multirresistência, dificultando o tratamento da doença (DIAS et al., 2013).

Em condições adversas, as bactérias do gênero *Salmonella* podem ser capazes de formar biofilme, formando uma massa celular por meio de filamentos de natureza proteica ou polissacarídica, que facilita sua adesão em superfícies bióticas ou abióticas, possibilitando a sua multiplicação nesses locais (WINFIELD & GROISMAN, 2003). A formação de biofilme é preocupante uma vez que as bactérias envolvidas nessa organização possuem maior capacidade de resistência às condições de estresse, bem como aos antimicrobianos e desinfetantes (HOIBY et al., 2010), garantindo a manutenção dos micro-organismos no biofilme. Além disso, a formação de biofilme constitui um perigo permanente de contaminação dos alimentos produzidos na superfície em que estão aderidos, trazendo riscos à saúde do consumidor.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme em aço inoxidável e o perfil de resistência fenotípico e genotípico a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos e ambiente de processamento de alimentos.

### **2. METODOLOGIA**

## 2.1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

Foram selecionados vinte e seis isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos e ambiente de processamento de alimentos, oriundos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA/FAEM/UFPEL).

Para avaliação da capacidade de formação de biofilme, os isolados cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA) (37 °C / 24 h) foram padronizados na escala 0,5 de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Após, uma alíquota (1 mL) foi transferida para tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) onde estavam imersos cupons de aço inoxidável (1 cm<sup>2</sup>) e os tubos foram incubados a 10 e 22 °C por 48 h. Em seguida, foram realizadas as lavagens e diluições decimais, com posterior semeadura em placas de Petri contendo TSA, e incubou-se a 37 °C por 24 h (FERNANDES, 2014). O teste foi realizado em triplicata.

## 2.2 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado pela técnica de disco difusão em ágar, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Foram testados 15 antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, cefalotina, gentamicina, tobramicina, estreptomicina, imipenem, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, sulfonamida, trimetoprim/sulfametoxazol, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol. O teste foi realizado em duplicata.

## 2.3 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GENES DE RESISTÊNCIA

Os isolados que apresentaram perfil fenotípico de resistência foram submetidos à técnica de PCR para detecção de genes de resistência. Foram avaliados os genes para classe dos  $\beta$ -lactâmicos (*bla*<sub>TEM</sub>), aminoglicosídeos (*aadA*, *strA* e *strB*), tetraciclinas (*tetA*, *tetB*), inibidores da síntese do folato (*sul1*, *sul2* e *dfrA*) e fenicóis (*catA1* e *floR*). As condições de cada reação seguiram os protocolos dos autores dos respectivos *primers*. Os produtos gerados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, durante 70 minutos, e em seguida, o gel foi analisado em transiluminador.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um isolado bacteriano é considerado como formador de biofilme, em superfície de aço inox, quando alcança concentrações microbianas superiores a 5 log UFC.cm<sup>-2</sup> (RONNER e WONG, 1993). De acordo com esse critério, todos os 26 isolados de *Salmonella* spp. avaliados neste estudo foram formadores de biofilme, tanto a 10 como a 22 °C. A média das contagens bacterianas variou entre 5,2 e 7,6 log UFC.cm<sup>-2</sup> a 10 e 22 °C, respectivamente. Observou-se uma maior formação de biofilme a 22 °C, o que corrobora o estudo realizado por KARACA et al. (2013), que avaliaram a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Salmonella* spp. oriundos de produtos de origem animal, nas temperaturas de 5, 22 e 37 °C.

Todos os 26 isolados (100%) avaliados foram sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, cefotaxima, cefalotina, tobramicina, imipenem e ciprofloxacina, sendo esse resultado semelhante ao encontrado por PANDINI et al. (2015). Em contrapartida, resistência a sulfonamidas e estreptomicina foi observada em 6 isolados (23,07%), à tetraciclina em 5 isolados (19,23%), ampicilina, ácido nalidíxico, sulfametoxazol-trimetoprim e trimetoprim em 4 isolados (15,38%) e cloranfenicol em 3 isolados (11,53%).

Apesar de 16 isolados (61,53%) apresentarem sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, 10 (38,46%) apresentaram perfil de resistência e 7 (26,92%) apresentaram perfil de multirresistência. As bactérias que apresentam resistência ou multirresistência possuem potencial de disseminação mais rápido e menor resposta ao tratamento, gerando infecções mais graves e persistentes (BAUER-GARLAND et al., 2006).

Maior percentual de resistência foi observado para estreptomicina (23,07%), sulfonamidas (23,07%) e tetraciclina (19,23%). CHEN et al. (2014) também encontraram maior resistência a esses antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp., provenientes de carne comercializada em supermercados da cidade de Washington, EUA, em 61%, 42% e 68%, respectivamente. Essas maiores taxas podem ser justificadas pela intensa utilização desses fármacos na produção animal (LOPES et al., 2014).

Dentre os isolados com perfil fenotípico de resistência, 7 (26,92%) apresentaram genes de resistência para pelo menos uma classe de antimicrobianos. Foram detectados os genes *aadA* (5/7), *bla<sub>TEM</sub>*, *sul1* e *tetA* (4/7), *strA*, *strB* e *floR* (2/7), *sul2*, *tetB* e *catA1* (1/7). Outros estudos também apresentaram resultados elevados para a presença dos genes de resistência *tetA*, *sul1* e *strA-strB*, e menor presença dos genes *sul2* e *tetB* (CHEN et al., 2004; NDE e LOGUE, 2008). A presença de genes de resistência é preocupante, pois estes podem estar localizados em plasmídeos e transposons, os quais podem ser transferidos entre as células bacterianas, aumentando o número de isolados resistentes e promovendo a disseminação da resistência a antimicrobianos (SCHWARZ et al., 2016).

#### 4. CONCLUSÕES

Isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos de origem animal e ambiente de processamento de alimentos apresentam capacidade de formar biofilme em superfície de aço inoxidável, evidenciando riscos de contaminação cruzada com alimentos. Além disso, um número considerável de isolados apresentou resistência ou multirresistência a antimicrobianos, inclusive albergando genes de resistência, o que constitui um risco à saúde pública.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER-GARLAND, J.; FRYE, J.G.; GRAY, J.T.; BERRANG, M.E.; HARRISON, M.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Transmission of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in poultry with and without antimicrobial selective pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1301-1308, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2017**. Acessado em 23 de setembro de 2017. Online. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/oministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta>.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; SCHROEDER, C. M.; LU, R.; YANG, H.; McDERMOTT, P. F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of Multiple Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova York, v.70, p.1-7, 2004.

CLSI. M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. 2015.

DIAS, F. S.; RAMOS, C. L.; ÁVILA, A. R. A.; SANTOS, M. R. R. M.; SCHWAN, R. F. Identification of *Salmonella* isolated from pork sausage and evaluation of thermal and antimicrobial resistance of isolates. **African Journal of Microbiology Research**, Alexandria, v.7, n.44, p.5070-5075, 2013.

FERNANDES, M. S; FUJIMOTO G; SCHNEID, I., KABUKI, D. Y; KUAYE, A. Y. Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. **International Dairy Journal**, v.38, p.16–23, 2014.

HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.35, p.322–332, 2010.

KARACA, B.; AKCELIK, N.; AKCELIK, M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. **Section Cellular and Molecular Biology**, v.68, p.110, 2013.

LOPES, G. V.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Identification and characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates carrying a new *aadA26* gene cassette in a class 1 integron obtained at pig slaughterhouses. **FEMS Microbiology Letters**, v.356, p.1–78, 2014.

NDE, C. W.; LOGUE, C. M. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p.215-223, 2008.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Animal Pathology**, v.82, p.1-6, 2015.

RONNER, A. B.; WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and Bunan rubber. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, p. 750-758, 1993.

SHINOHARA, N.K.S.; DE BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F; DE LIMA, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.13, n.5, p.1669-1674, 2008.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. **Veterinary Dermatology**, v.28, n.1, 82-107, 2016.

WINFIELD, M. D.; GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Nova York, v.69, n.7, p.3687–3694, 2003.