

CARACTERIZAÇÃO DE DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA A SANITIZANTES E METAIS PESADOS EM *Listeria monocytogenes* DE ORIGEM ALIMENTAR

KAUANA DOS SANTOS SOARES¹; LOUISE HAUBERT¹; WLADIMIR PADILHA
DA SILVA¹

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Laboratório de Microbiologia de Alimentos–
kauana_soares@hotmail.com
louisehaubert@hotmail.com
wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa, ubíqua, que pode ser persistente no ambiente de indústrias de processamento de alimentos (XU et al., 2016). O patógeno *L. monocytogenes* é responsável por causar listeriose, podendo acometer tanto humanos como animais. 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 considerada um importante problema de saúde pública (KATHARIOS-LANWERMEYER et al., 2012).

Listeria monocytogenes é um micro-organismo capaz de sobreviver a condições adversas comumente encontradas na produção de alimentos (XU et al., 2014), assim, indústrias de alimentos mantém um rigoroso controle sobre este patógeno. Porém, os processos de limpeza e sanitização podem ser insatisfatórios, favorecendo a ocorrência de estirpes resistentes aos produtos utilizados nestes processos, como os sanitizantes, 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 sanitizantes em bactérias, a qual pode ser transferida para outras bactérias (GREEN & SAMBROOK, 2012). A exposição sucessiva de *L. monocytogenes* a concentrações altas de cloreto de benzalcônio, por exemplo, resulta em mutantes com suscetibilidade reduzida para gentamicina. 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 sanitizantes, incluindo metais pesados como cádmio, representa uma importante estratégia para a sobrevivência bacteriana.

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo 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, bem como verificar a presença de genes de resistência a estes compostos.

2. METODOLOGIA

a) Isolados bacterianos

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 quanto aos 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, tetraciclina e aminoglicosídeos (*ereB*, *ermB*, *ermC*, *tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, Tn916-1545, *strA*, e *strB*) (HAUBERT et al., 2016).

b) Determinação da concentração inibitória mínima

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

Primeiramente, os isolados foram cultivados em ágar Soja Triptona (Oxoid) adicionado de 0,6% de Extrato de Levedura (HIMEDIA) a 37 °C durante 24 horas. Após a incubação, os isolados foram diluídos na concentração 2 da escala de McFarland em solução salina (Synth) a 0,85% e 5 µL foram adicionados sobre placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (Oxoid), suplementado com 2% de sangue desfibrinado de carneiro 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⁻¹), sob incubação a 37 °C durante 48 horas.

Para determinar a CIM para o cloreto de cádmio, foi utilizado ágar Brain Heart Infusion (KASVI), utilizando placas de Petri com diferentes concentrações de cádmio (2.5; 5; 10; 20; 35; 70; 140 e 200 µg.mL⁻¹) com incubação 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 a multiplicação 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 70 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os experimentos foram realizados em duplicata.

c) Avaliação de genes de resistência

A detecção de genes de resistência para cloreto de benzalcônio e cloreto de cádmio foi realizada através da técnica de PCR onde foram avaliados os genes *mdrL*, *lde*, *emrE*, *bcrABC*, *radC*, *qacA*, *qacC/D*, *qacH*, *qacEΔ1*, *cadA1*, *cadA2*, *cadA3*, *cadA4* e *cadC*. A extração de DNA genômico seguiu o protocolo descrito por GREEN & SAMBROOK (2012), com pequenas modificações.

Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cada oligonucleotídeo a uma concentração de 10 ou 20 pmol, 2 µL de DNA (50 ng) e 8,5 µL de água ultrapura (Promega) para um volume final de 25 µL. As misturas foram submetidas a um termociclador MJ Research® PTC 100 (Bio-Rad Laboratories). As condições de ciclagem seguiram as recomendações dos autores referenciados. Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese a 80 V por 70 min em gel de agarose a 1,5% p/v (Invitrogen) em tampão Tris/Acetato/EDTA 0,5 (TAE) utilizando marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen). Após, os produtos amplificados foram visualizados em um transiluminador UV (Loccus).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os 50 isolados de *L. monocytogenes* avaliados apresentaram perfil de resistência ao cloreto de benzalcônio (100%) e 29 isolados (58%) foram resistentes ao cloreto de cádmio. Segundo KATHARIOS-LANWERMEYER et al. (2012), as CIMs de 10 µg.mL⁻¹ e 70 µg.mL⁻¹ são consideradas perfis de resistência para cloreto de benzalcônio e cloreto de cádmio, respectivamente, em isolados de *L. monocytogenes*.

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⁻¹ para cloreto de benzalcônio e 70 µg.mL⁻¹ para o cádmio, que são superiores aos limites estabelecidos para considerar o micro-organismo resistente a esses compostos.

Observou-se que houve resistência cruzada entre o sanitizante cloreto de benzalcônio e o metal pesado cádmio em 29 isolados (58%). Resultados diferentes foram encontrados no estudo de ZHANG et al. (2015), onde 65% dos isolados de *L. monocytogenes* apresentaram resistência para o cádmio e apenas 15% para o cloreto de benzalcônio.

Segundo ZHANG et al. (2015), a determinação da resistência bacteriana é útil para entender e avaliar as condições de utilização dos sanitizantes, 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 sanitização e controle de *L. monocytogenes* com maior embasamento científico (XU et al., 2016).

Os 50 isolados de *L. monocytogenes* foram avaliados quanto aos genes relacionados a resistência aos sanitizantes e metais pesados, sendo que apenas as bombas de efluxo MdrL e Lde foram detectadas em 12 (24%) e 33 (66%) isolados, respectivamente.

Todos os isolados que abrigavam o gene *mdrL* (n = 12) também carregavam o gene *lde* e pertencem à linhagem II (sorotipos 1/2a e 1/2c), com exceção do isolado 23, pertencente ao sorotipo 1/2b (linhagem I). Por outro lado, todos os isolados que abrigavam apenas o gene *lde* (n = 21) pertencem à linhagem I (sorotipos 1/2b e 4b).

As bombas de efluxo MdrL e Lde pertencem à classe de bombas de efluxo *Major Facilitator Superfamily* (MFS), sendo que a bomba de efluxo MdrL pode extrusar cefalosporinas, macrolídeos, metais pesados e brometo de etídio (XU et al, 2014). Os isolados que carregavam o gene *mdrL* apresentaram resistência aos macrolídeos (HAUBERT et al., 2016) e cloreto de cádmio, sugerindo que a bomba MdrL está relacionada a estes perfis de resistência. Por outro lado, a bomba de efluxo Lde está associada à resistência a fluorquinolonas, laranja de acridina, brometo de etídio e cloreto de benzalcônio (ZHANG et al., 2015). Em nosso estudo, todos os isolados, mesmo aqueles portadores do gene *lde*, foram suscetíveis à ciprofloxacina, um antimicrobiano pertencente à classe das fluorquinolonas. Embora o gene *lde* tenha sido encontrado em isolados suscetíveis à ciprofloxacina, o perfil de resistência pode resultar em um aumento no nível de expressão dessa bomba, sendo necessárias outras técnicas para avaliar essa expressão (HAUBERT et al., 2016). Além disso, sugere que a presença do gene *lde* em alguns isolados esteja relacionada com o perfil de resistência ao cloreto de benzalcônio.

4. CONCLUSÕES

Listeria monocytogenes provenientes de ambientes de processamento de alimentos e alimentos do sul do Brasil apresentam perfil de resistência ao cloreto de benzalcônio e ao cloreto de cádmio. O cloreto de benzalcônio é amplamente utilizado nas indústrias alimentícias em nosso país e, portanto, deve-se ter mais cautela quanto ao uso racional destes compostos. Mais da metade dos isolados apresentaram resistência cruzada ao sanitizante cloreto de benzalcônio e ao metal pesado cloreto de cádmio, o que é preocupante com relação a resistência bacteriana. Foi observada a presença de bombas de efluxo (MdrL e Lde), relacionadas aos perfis de resistência encontrados, resultados reportados pela primeira vez no Brasil. Diante disso, mais estudos são necessários para quantificar a expressão das bombas de efluxo em *L. monocytogenes* sob diferentes condições.

5. 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.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition) (Cold Spring). 2012.

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, 2016.

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.

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.