

RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS EM ISOLADOS DE *Salmonella spp.* ORIUNDOS DE ALIMENTOS

LETÍCIA KLEIN SCHEIK¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; LISSETH
PERALTA CANCHIS²; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES²; ISABELA
SCHNEID KRÖNING²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – leticiascheik@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - itianebarcellosj@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - lpc_07@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - pam.inchauspe@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas - isabelaschneid@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas - wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Salmonella spp. é a segunda bactéria que mais causa Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) no mundo (CDC, 2018), e representa o gênero de maior importância dentre as Enterobactérias, sendo capaz de colonizar o trato intestinal de diversos animais, como mamíferos, répteis e pássaros. O consumo de carne suína e de aves, bem como de alimentos derivados destas carnes, como por exemplo linguiças, por muitas vezes com cocção insuficiente no preparo, pode causar a salmonelose em humanos (BARILLI et al., 2018).

A salmonelose em humanos pode apresentar, como sintomatologia, diarreia, vômito, febre e cólicas abdominais, geralmente sendo autolimitante (onde os sintomas cessam entre cinco e sete dias após o início da infecção). Entretanto, indivíduos do grupo de risco, como crianças, idosos e imunocomprometidos tendem a desenvolver uma infecção mais severa, sendo necessário o tratamento com antimicrobianos (CDC, 2018), aos quais as bactérias podem adquirir resistência.

A resistência bacteriana a antimicrobianos ocorre, principalmente, como consequência do uso inadequado dessas substâncias na terapêutica humana, bem como na criação de animais, elevando o risco de selecionar isolados bacterianos multirresistentes (POPOFF; LE MINOR, 2015). Primeiramente, recomendava-se o tratamento de casos de salmonelose em humanos com antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim. Entretanto, com o aumento da resistência a estas substâncias em estirpes de *Salmonella spp.* nos últimos 20 anos, antimicrobianos das classes das quinolonas, macrolídeos e cefalosporinas de terceira geração vêm sendo amplamente utilizados (BARILLI et al., 2018).

Diversos são os mecanismos bacterianos de resistência a compostos antimicrobianos, como bombas de efluxo presentes na parede celular bacteriana, que expulsam essas substâncias para fora da célula, bem como enzimas que degradam as moléculas dos compostos antimicrobianos, fazendo com que estes percam sua ação bactericida. As β -lactamas, por exemplo, são enzimas codificadas por genes, dentre estes o *bla_{TEM}*, muitas vezes localizados em plasmídeos, que podem ser transferidos para outras bactérias através da conjugação de genes de resistência (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002), tornando isolados suscetíveis em resistentes.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella spp.* provenientes de alimentos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Trinta isolados de *Salmonella* spp., provenientes de alimentos analisados no período de janeiro de 2018 a junho de 2019, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPEL), foram avaliados em relação a sua suscetibilidade a antimicrobianos através do teste de disco difusão em ágar, de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), seguindo os parâmetros para bactérias da família Enterobacteriaceae.

Os antimicrobianos testados foram das classes dos β -lactâmicos (ampicilina 10 μ g, amoxicilina-ácido clavulânico 20/10 μ g, cefotaxima 10 μ g, cefalotina 30 μ g e imipenem 10 μ g); aminoglicosídeos (estreptomicina 10 μ g, gentamicina 10 μ g e tobramicina 10 μ g), fenicóis (cloranfenicol 30 μ g); inibidores da síntese do folato (sulfonamida 300 μ g, trimetroprim-sulfametoxazol 1.25/23.75 μ g, trimetroprim 30 μ g); quinolonas (ácido nalidíxico 30 μ g e ciprofloxacina 5 μ g); e tetraciclinas (tetraciclina 30 μ g).

Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI, sendo os isolados considerados suscetíveis, resistentes intermediários ou resistentes. A presença de genes de resistência a antimicrobianos também foi avaliada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando as sequências de oligonucleotídeos para os genes relacionados as resistências encontradas no teste fenotípico (*blaZ*, *bla_{TEM}*, *aadA*, *aadB*, *aac(6')-Ib*, *strA*, *strB*, *int1*, *sul1*, *sul2*, *sul3*, *dfrA*, *dfrD*, *tetA*, *tetB*, *catA1*, *floR*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste fenotípico de resistência a antimicrobianos, a resistência a ampicilina foi a mais prevalente, verificada em 23 isolados (76,66%), seguido da resistência a tetraciclina, que foi encontrada em 22 isolados (73,33%). Esse resultado é superior ao observado por HAUBERT et al. (2018), que encontraram 19,23% dos isolados resistentes a tetraciclina. A resistência a estes antimicrobianos é comumente relacionada ao seu uso na alimentação animal, bem como na terapêutica preventiva de doenças infecciosas na produção de bovinos, aves e suínos de corte (BROWN et al., 2016; ZHANG et al., 2015). A resistência intermediária foi identificada em 13 (43,33%), nove (30%), sete (23,33%), dois (6,66%) e um (3,33%) isolados para cefalotina, ciprofloxacina, ácido nalidíxico e estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente.

Todos os 30 isolados avaliados (100%) foram suscetíveis a amoxicilina-ácido clavulânico, cefotaxima, imipenem e tobramicina. Entretanto, quatro isolados (13,33%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados, dois isolados (6,66%) apresentaram somente um perfil de resistência, e 23 isolados (76,66%) demonstraram perfil de multirresistência, sendo resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (EFSA, 2013). A multirresistência em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos deve ser tratada como um problema mundial de saúde pública (SIRIKEN; AL; EROL, 2019), pois provoca uma pressão seletiva e consequente disseminação de isolados resistentes a antimicrobianos.

Os 26 isolados de *Salmonella* spp. que apresentaram perfil fenotípico de resistência foram avaliados para os respectivos genes de resistência. Vinte e quatro isolados (92,31%) apresentaram genes de resistência a antimicrobianos. Todos os isolados com perfil de resistência para o ácido nalidíxico (n=14) apresentaram genes de resistência para a respectiva classe de antimicrobianos

(quinolonas), e dos 22 isolados resistentes a tetraciclina, dezesseis (72,72%) apresentaram genes que conferem resistência à essa classe de antimicrobianos (Tabela 1).

Tabela 1. Genes de resistência a antimicrobianos encontrados nos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de alimentos

Gene	Classe de antimicrobianos	% de isolados positivos
<i>bla_{TEM}</i>	β-lactâmicos	73,08
<i>aadA</i>	aminoglicosídeos	33,33
<i>strA</i>	aminoglicosídeos	81,81
<i>strB</i>	aminoglicosídeos	81,81
<i>int1</i>	aminoglicosídeos	58,33
<i>floR</i>	fenicóis	80,00
<i>gyrA</i>	quinolonas	100
<i>gyrB</i>	quinolonas	100
<i>parC</i>	quinolonas	78,57
<i>parE</i>	quinolonas	100
<i>sul1</i>	sulfonamidas	73,33
<i>sul2</i>	sulfonamidas	40,00
<i>tetA</i>	tetraciclinas	72,72
<i>tetB</i>	tetraciclinas	27,27

Além dos elevados níveis de resistência genotípica encontrados nos isolados de *Salmonella* spp., a detecção do gene *int1* em 58,33% dos isolados sugere a probabilidade de estas bactérias transferirem seus genes que conferem resistência a antimicrobianos para isolados suscetíveis. Este gene codifica para a proteína integrase de classe 1 que, se presente em um elemento genético móvel como um *integron*, permite a disseminação de genes de resistência para bactérias suscetíveis através da transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos, colaborando para o aumento dos índices de isolados multirresistentes (DI CONZA; GUTKIND, 2010).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram a presença de resistência e multirresistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de alimentos. Além disso, a presença do gene *int1* em mais da metade dos isolados denota preocupação, pois pode facilitar a disseminação de resistência para outras bactérias.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARILLI, E.; BACCI, C.; STELLAVILLA, Z.; MERALDI, G.; D'INCAU, M.; BRINDANI, F.; VISMARRA, A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 2, p. 7223, 2018.
- BROWN, A. C.; GRASS, J. E.; RICHARDSON, L. C.; NISLER, A. L.; BICKNESE, A. S.; GOULD, L. H. Antimicrobial resistance in *Salmonella* that caused foodborne disease outbreaks: United States, 2003–2012. **Epidemiology and Infection**, p. 1–9, 2016.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Salmonella Infection**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/healthypets/diseases/salmonella.html>>. Acesso em: Agosto de 2018.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement. CLSI Document M100-S24. Wayne, PA.
- DI CONZA, J. A.; GUTKIND, G. O. Integrons: gene collectors. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 42, n. 1, p. 63-78, 2010.
- EFSA-European Food Safety Authority. Relatório de síntese da União Européia sobre resistência antimicrobiana em **Resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas e indicadoras provenientes de seres humanos, animais e alimentos na União Européia em 2011**. **EFSA Journal**, v. 11, p. 1–359, 2013.
- HAUBERT, L.; ZEHETMEYR, M. L.; PEREIRA, Y. M. N.; KRONING, I. S.; MAIA, D. S. V.; SEHN, C. P.; LOPES, G. V.; DE LIMA, A. S.; DA SILVA, W. P. Tolerance to benzalkonium chloride and antimicrobial activity of *Butia odorata* Barb. Rodr. extract in *Salmonella* spp. isolates with biofilm forming ability. **Food Research International**, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.08.092.
- PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1-11, 2002.
- POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. **Salmonella**. In: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. 79 págs. 2015.
- SIRIKEN, B.; AL, G.; EROL, I. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in ground beef and meatball samples in Samsun, Turkey. **Microbial Drug Resistance**, 9 págs., 2019.
- ZHANG, J.; YANG, X.; KUANG, D.; SHI, X.; XIAO, W.; ZHANG, J.; MENG, J. Prevalence of antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serovars in retail aquaculture products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 47–52, 2015.