

***Listeria monocytogenes* DE ORIGEM ALIMENTAR COM PERFIL DE MULTIRRESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES**

ITIANE BARCELLOS JASKULSKI¹; LETÍCIA KLEIN SCHEIK²; LOUISE HAUBERT³; GRACIELA VÖLZ LOPES⁴; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – leticiascheik@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um importante patógeno de origem alimentar, com característica ubiquitária, podendo ser isolado de diversos pontos da cadeia produtiva de alimentos e alimentos prontos para o consumo (SELVAGANAPATHI et al., 2018). O patógeno é o agente etiológico da listeriose em humanos, a qual, em indivíduos saudáveis, segue um curso não invasivo, com sintomas como gastroenterite leve. No entanto, em indivíduos do grupo de risco (gestantes, idosos, recém-nascidos e imunocomprometidos) a infecção pode ocorrer na forma invasiva grave, ocasionando sintomas como aborto, septicemia, encefalite e meningite, possuindo uma taxa de letalidade em torno de 30% (DE NOORDHOUT et al., 2014; WHO, 2018).

O tratamento para listeriose é realizado utilizando-se β -lactâmicos sozinhos ou em associação com aminoglicosídeos, no entanto, o uso inadequado desses antimicrobianos tem contribuído significativamente para o aumento das taxas de resistência em *L. monocytogenes* (KRAWCZYK-BALSKA et al., 2012). Na última década, diversos relatos apontam o aumento do número de isolados de origem alimentar com perfis de multirresistência a antimicrobianos (HAUBERT et al., 2016; KEVENK; TERZI GULEL, 2016). Além disso, há relatos sobre isolados com resistência à sanitizantes químicos (ROMANOVA; FAVRIN; GRIFFITHS, 2002). Este cenário pode dificultar a eficácia de protocolos terapêuticos para listeriose, além de impossibilitar a eliminação do patógeno em ambientes de processamento de alimentos (CARVALHO et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos e sanitizantes em isolados de *L. monocytogenes* provenientes de alimentos e ambientes de processamento de alimentos do sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Isolados bacterianos

Foram utilizados 82 isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças de ovino ($n=6$), queijo minas artesanal ($n=5$), salsicha mista frescal ($n=6$), carcaças de frango ($n=6$), carcaças bovinas ($n=14$), linha de embutidos frescais ($n=5$), abatedouro de frangos ($n=16$), planta de processamento de carne ($n=4$), beef jerky ($n=2$), linha de processamento de beef jerky ($n=4$), queijo fatiado ($n=2$) e presunto fatiado ($n=12$), todos previamente caracterizados e pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (DCTA/FAEM/UFPEl).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Foi utilizado o método de disco-difusão em ágar, de acordo com as especificações do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2014). Foram avaliados 16 antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), estreptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), penicilina G (10 U), rifampicina (5 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg) e sulfametoxazol + trimetoprima (23.75 µg + 1,25 µg).

Concentração inibitória mínima (CIM) para sanitizantes

Foi realizado o teste de CIM para o cloreto de benzalcônio (Sigma-Aldrich®, Irvine, UK), clorexidina (Sigma-Aldrich®, Irvine, UK), hipoclorito de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda, Brasil) e ácido peracético (Proc9 Indústria, Brasil) de acordo com as especificações de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017) com pequenas modificações. Após a reativação dos isolados, suspensões bacterianas foram preparadas em solução salina a 0,85% (p/v) (Synth, Brasil), utilizando a escala McFarland número 2 (6×10^8 UFC.mL⁻¹). As placas de microtitulação (CralPlast, Brasil) foram preenchidas com as suspensões bacterianas e o caldo de Mueller-Hinton (MH, Oxoid, UK) na proporção de 1:9, utilizando concentrações variáveis dos compostos (variando de 0,25 a 2048 mg.L⁻¹) com incubação a 37 °C por 24 horas. A CIM foi definida como a menor concentração que impede a multiplicação visível dos isolados.

Ensaio de PCR para detecção de genes de resistência

Isolados que apresentaram perfil de multirresistência a antimicrobianos no método disco-difusão em ágar, foram investigados quanto à presença de genes de resistência previamente relatados nesta espécie bacteriana. Genes que codificam a resistência a macrolídeos (*ereB*, *ermB* e *ermC*), aminoglicosídeos (*strA* e *strB*), tetraciclina (*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* e *Tn916-1545*) e sulfonamidas (*sul1* e *sul2*) foram investigados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os 82 isolados de *L. monocytogenes*, 52 (63,4%) foram resistentes a um ou mais antimicrobianos e 30 (36,6%) foram suscetíveis a todos os antimicrobianos testados. Foi observada resistência à clindamicina (48,8%), meropenem (28%), sulfametoxazol + trimetoprima (28%), rifampicina (13,4%), eritromicina (11%), tetraciclina (8,5%), estreptomicina (6,1%) e amicacina (4,9%). Todos os isolados avaliados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e a cefoxitina (100%), porém, ressalta-se que se trata de resistência intrínseca de *L. monocytogenes* (TROXLER et al., 2000). Não foi observada resistência à ampicilina, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, penicilina G ou vancomicina. A resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foi observada em 17% (n=14) dos isolados, sendo considerados multirresistentes.

Com relação ao perfil genotípico de resistência antimicrobiana, todos os isolados que apresentaram resistência à tetraciclina (8,5%) carregavam os genes *tet(M)* e *tet(L)* (**Tabela 1**). Os demais genes investigados não foram detectados. O principal genótipo de resistência à tetraciclina encontrado em *Listeria* spp. é o gene *tet(M)*, um gene de proteção ribossômica encontrado com mais frequência no cromossomo (WANG et al., 2013). HAUBERT et al. (2015) encontraram o gene *tet(M)* em isolados multirresistentes de *L. monocytogenes* de origem alimentar,

resultado semelhante ao obtido neste estudo. Em contrapartida, não identificaram o gene *tet(L)*, o qual é codificado por uma bomba de efluxo presente em um plasmídeo.

Tabela 1 Perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos em isolados multirresistentes de *Listeria monocytogenes* de origem alimentar

ID*	Perfil de multirresistência	n (%)	Origem (n)	Gene de resistência
P1	AMI-MER-SUT	3 (3,6)	Carcaça de bovino (3)	-
P2	EST-CLI-RIF-MER-SUT	1 (1,2)	Abatedouro de frango (1)	-
P3	CLI-ERI-MER-RIF-SUT-TET	5 (6,1)	Linha de processamento de beef jerky (3) Beef jerky (2)	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>
P4	EST-ERI-CLI-RIF-MER-SUT	4 (4,9)	Salsicha mista frescal (3) Linha de processamento de embutidos frescos (1)	-
P5	AMI-CLI-ERI-MER-RIF-SUT-TET	1 (1,2)	Linha de processamento de beef jerky (1)	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>

AMI: amicacina, CLI: clindamicina, EST: estreptomicina, ERI: eritromicina, MER: meropenem, RIF: rifampicina, SUT: sulfametoxazol + trimetoprima, TET: tetraciclina.

* Perfis fenotípicos

Quanto ao teste de suscetibilidade aos sanitizantes, os isolados apresentaram maior suscetibilidade ao composto clorexidine, sendo inibidos em concentrações de 2 a 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para cloreto de benzalcônio os isolados foram inibidos em concentrações de 10 a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, já para hipoclorito de sódio e ácido peracético, os isolados apresentaram suscetibilidade extremamente reduzida, havendo multiplicação visível em concentrações $\geq 2048 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Embora não existam valores de referência que definam a resistência de micro-organismos aos sanitizantes, a multiplicação dos isolados foi observada mesmo em altas concentrações dos compostos avaliados. O resultado é preocupante, haja vista a comum utilização destes sanitizantes na indústria de alimentos (LEE; HUANG et al., 2019).

4. CONCLUSÕES

O monitoramento da suscetibilidade aos antimicrobianos e sanitizantes é de interesse de saúde pública e os resultados obtidos neste estudo confirmam a ocorrência de perfil de multirresistência a agentes antimicrobianos clinicamente relevantes, incluindo isolados portadores de genes de resistência, além de elevados valores de CIM para os compostos sanitizantes. A identificação destes isolados circulantes na indústria de alimentos e em alimentos prontos para o consumo é de extrema importância para compreensão do desenvolvimento e difusão da resistência, fornecendo dados relevantes de avaliação de risco e avaliando intervenções direcionadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARVALHO, F.T.; VIEIRA, B.S.; VALLIM, D.C.; CARVALHO, L.A.; CARVALHO, R.C.; PEREIRA, R.C.; FIGUEIREDO, E.E. Genetic similarity, antibiotic resistance and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat

and chicken-meat processing environment in Mato Grosso, Brazil. LWT, v.109, p.77-82, 2019.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017

EUCAST. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility. Version 4.0. p. 1–24, 2014.

Disponível em:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/Version_4/Reading_guide_v_4.0_EUCAST_Disk_Test.pdf.

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, v.62, n.1, p.23-29, 2016.

KEVENK, T.O.; TERZI GULEL, G. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products: Prevalence, antimicrobial resistance. Journal of Food Safety, v.36, n.1, p.11–18, 2016

KRAWCZYK-BALSKA, A.; MARCHLEWICZ, J.; DUDEK, D.; WASIAK, K.; SAMLUK, A. Identification of a ferritin-like protein of *Listeria monocytogenes* as a mediator of β -lactam tolerance and innate resistance to cephalosporins. BMC microbiology, v.12, n.1, p.278, 2012.

LEE, W.N.; HUANG, C.H. Formation of disinfection by products in wash water and lettuce by washing with sodium hypochlorite and peracetic acid sanitizers. Food Chemistry: X, Atlanta, v.1, n.100003, 2019.

MEWIS, I.; ULRICH, C.H. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Stored Product Research, Amsterdam, v.37, n.1, p.153-164, 2001.

ROMANOVA, N.; FAVRIN, S.; GRIFFITHS, M.W. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry. Applied and Environmental Microbiology, v.68, n.12, p.6405–6409, 2002.

SELVAGANAPATHI, R.; JEYASEKARAN, G.; SHAKILA, R.J.; SUKUMAR, D.; KUMAR, M.P.; SIVARAMAN B. Occurrence of *Listeria monocytogenes* on the seafood contact surfaces of Tuticorin Coast of India. Journal Food Science and Technology, v.55, p.1–5, 2018.

TROXLER, R.; VON GRAEVENITZ, A.; FUNKE, G.; WIEDEMANN, B.; STOCK, I. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clinical Microbiology and Infection, v.6, p.525–535, 2000.

WANG, X.M.; LU, X.F.; YIN, L.; LIU H.F.; ZHANG, W.J.; SI W.; YU, S.Y.; SHAO, M.L. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. Food Control, v.32, p.153–158, 2013.

WHO. Antimicrobial resistance. World Health Organization, 31 jul. 2020. Acessado em 1 de set. 2020. Online. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.