

RESISTÊNCIA FENOTÍPICA E GENOTÍPICA A SANITIZANTES EM ISOLADOS DE *Salmonella* spp. MULTIRRESISTENTES A ANTIMICROBIANOS ORIUNDOS DE PRODUTOS CÁRNEOS

LETÍCIA KLEIN SCHEIK¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; LISSETH PAMELA PERALTA-CANCHIS²; ANDREIA SALDANHA DE LIMA²; GRACIELA VOLZ LOPES²; 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 – andreia@ufpel.edu.br

²Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

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

1. INTRODUÇÃO

A salmonelose, infecção causada por *Salmonella* não tifoidal, pode apresentar como sintomatologia em humanos, diarreia, vômitos, febre e cólicas abdominais. Geralmente, a salmonelose é autolimitante, com os sintomas cessando entre cinco e sete dias após o início da infecção, porém, crianças, idosos e indivíduos com o sistema imune debilitado, tendem a desenvolver uma infecção mais severa (CDC, 2018). Por ser uma bactéria naturalmente presente no trato intestinal de mamíferos e aves, o consumo de carnes e produtos cárneos representam uma importante via de transmissão deste patógeno, e as carnes suína e de frango, bem como seus derivados, com cocção insuficiente, são as principais causas de transmissão de *Salmonella* spp. aos humanos (BARILLI et al., 2018).

Os compostos sanitizantes são agentes biocidas ativos frequentemente aplicados nas etapas de sanitização de superfícies, equipamentos e utensílios em abatedouros e plantas de processamento de alimentos, principalmente por sua capacidade de inibir ou matar um amplo espectro de micro-organismos, como as bactérias, reduzindo assim a contaminação dos alimentos e consequentemente, o risco de infecção aos consumidores (GANTZHORN et al., 2014). Apesar de a sanitização realizada nas indústrias de alimentos reduzir a exposição de patógenos aos humanos, o uso frequente e indevido, destes compostos, como a aplicação de subdoses, pode conduzir a uma pressão seletiva, aumentando a incidência de bactérias cada vez menos suscetíveis aos sanitizantes utilizados (BRIDIER et al., 2011).

WU et al. (2015) observaram que isolados de *Salmonella* spp. provenientes de amostras de swab de cloaca de frango, bem como isolados de cortes de frango, apresentaram altos valores de concentração inibitória mínima (CIM) para compostos quaternários de amônio (CQA), e que a resistência a estes sanitizantes pode estar relacionada com a resistência a antimicrobianos nesses isolados. Além disso, genes que conferem resistência aos CQA, como os genes *qacA* e *qacEΔ1*, já foram encontrados em plasmídeos de resistência de bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, podendo ser transferidos para outras espécies bacterianas através de transferência horizontal (WU et al., 2015; ZOU et al., 2014), disseminando esta característica para a população bacteriana do ambiente de processamento de alimentos.

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil fenotípico e genotípico de resistência a sanitizantes em isolados de *Salmonella* spp.

multirresistentes a antimicrobianos provenientes de produtos cárneos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Vinte e um isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos analisados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA/FAEM/UFPEL), previamente caracterizados como multirresistentes a antimicrobianos, foram avaliados em relação a sua suscetibilidade a sanitizantes através do teste de concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com a metodologia descrita por WU et al. (2015). Foram testados quatro compostos, sendo estes: um CQA (cloreto de benzalcônio, CB), uma biguanida (clorexidina, CLX), um ácido orgânico (ácido peracético, APC) e um composto clorado (hipoclorito de sódio, HS). Primeiramente, os isolados de *Salmonella* spp. foram cultivados em ágar Triptona de Soja (TSA) a 37 °C por 24 h. Após este período de incubação, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,85% (p/v), seguindo a escala 0,5 de McFarland, equivalente a 10^8 UFC.mL⁻¹. Microplacas de poliestireno de 96 cavidades foram preenchidas na proporção 1:9 com os inóculos dos isolados e caldo Mueller-Hinton (MH) contendo as concentrações dos compostos sanitizantes avaliados, variando de 0,25 a 128 mg.L⁻¹ para o CB e CLX; e 64 a 2048 mg.L⁻¹ para o APC e HS. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, a CIM foi definida como a menor concentração dos compostos capaz de inibir a multiplicação bacteriana visível.

A presença de genes relacionados à resistência a sanitizantes também foi avaliada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando sequências de oligonucleotídeos para os seguintes genes: *qacA*, *qacEΔ1*, *smr*, *mepA*, *norA* e *norB*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *Salmonella* spp. avaliados (100%) apresentaram CIM de 32 mg.L⁻¹ para o CB; quinze isolados (71,43%) apresentaram CIM de 16 mg.L⁻¹, seis isolados (28,57%) apresentaram CIM de 32 mg.L⁻¹ para a CLX; e os 21 isolados (100%) apresentaram CIM de 1024 mg.L⁻¹, tanto para o APC como para o HS. HUMAYOUN et al. (2018), avaliaram 88 isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes a antimicrobianos provenientes de animais (bovinos, suínos, frangos, perus, equinos, cães e gatos) e carne bovina, e observaram que 95% dos isolados obtiveram CIM de 40 mg.L⁻¹ para o CB, valor semelhante ao encontrado neste estudo. Já para a CLX, o valor de CIM mais recorrente nos isolados testados foi de 3 mg.L⁻¹ (29%), seguido de 25% dos isolados com CIM de 12 mg.L⁻¹, sendo estes isolados mais suscetíveis a este composto do que os isolados avaliados no presente estudo.

Embora não existam valores de corte para definir a resistência bacteriana aos compostos sanitizantes, observou-se multiplicação visível mesmo em concentrações mais elevadas de APC e HS. Este é um resultado interessante, já que estes compostos são amplamente utilizados em diferentes etapas de sanitização na linha de processamento de alimentos (LEE; HUANG, 2019). No estudo de HUMAYOUN et al. (2018), 90% dos isolados apresentaram CIM entre 880-1760 mg.L⁻¹ para o APC, e quase metade dos isolados (43%) apresentaram

CIM de 6304 mg.L⁻¹ para o HS, valor este significativamente mais elevado que o encontrado neste estudo.

Dentre os genes relacionados à resistência a sanitizantes pesquisados, somente o gene *qacEΔ1* foi encontrado, em nove isolados (42,86%), sendo que destes, cinco (55,55%) pertencem ao sorovar *S. Anatum*; os demais isolados pertencem a quatro sorovares distintos (*S. Senftenberg*, *S. Lexington*, *S. Typhimurium* e *S. Derby*) (Tabela 1). De acordo com WU et al. (2015), o gene *qacEΔ1* é frequentemente presente em *E. coli* e *Salmonella* spp., e LONG et al. (2016) também observaram que o gene *qacEΔ1* foi o mais prevalente (presente em 26,7% dos isolados de *Salmonella* spp. proveniente de frango e ovos), sendo este gene mais frequentemente encontrado no sorovar *S. Derby*.

Tabela 1. Isolados de *Salmonella* spp. que portavam o gene *qacEΔ1*

Isolado	Alimento	Sorovar	CIM dos sanitizantes (mg.L ⁻¹)			
			CB	CLX	APC	HS
S1	Linguiça mista frescal	Anatum	32	16	1024	1024
S2	Linguiça mista frescal	Anatum	32	32	1024	1024
S3	Linguiça suína seca defumada	Anatum	32	32	1024	1024
S4	Carne suína	Anatum	32	32	1024	1024
S5	Linguiça suína frescal	Anatum	32	32	1024	1024
S6	Linguiça suína frescal	Senftenberg	32	16	1024	1024
S7	Alcatra embalada a vácuo	Lexington	32	32	1024	1024
S8	Linguiça suína	Typhimurium	32	32	1024	1024
S9	Linguiça suína	Derby	32	16	1024	1024

CB: cloreto de benzalcônio; CLX: clorexidina; APC: ácido peracético; HS: hipoclorito de sódio.

Dos seis isolados que apresentaram um valor de CIM maior para a CLX (32 mg.L⁻¹), quatro (66,66%) pertencem ao sorovar *S. Anatum*, e todos os seis isolados (100%) apresentaram o gene *qacEΔ1*, como pode-se observar na Tabela 1. O gene *qacEΔ1* está localizado na porção conservada 3' dos *integrans* de classe 1, um elemento genético móvel que codifica para genes que podem conferir resistência a antimicrobianos (CHAPMAN, 2003). Além disso, a presença do gene *qacEΔ1* é frequentemente associada a isolados resistentes a antimicrobianos e que apresentam elevadas CIM aos CQA, como o CB (ZOU et al. 2014; WU et al. 2015).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram valores de CIM para compostos sanitizantes entre os isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos, semelhantes aos relatados na literatura científica. Além disso, o gene *qacEΔ1* esteve presente em quase metade dos isolados, podendo estar relacionado aos perfis de resistência a antimicrobianos destes isolados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARILLI, E.; BACCI, C.; STELLAVILLA, Z.; MERIALDI, 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.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSENET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, p. 1017-1032, 2011.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Salmonella Infection**. 2018. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/healthypets/diseases/salmonella.html>>. Acesso em: Setembro de 2020.

CHAPMAN, J. S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 51, p. 271–276, 2003.

GANTZHORN, M. R.; PEDERSEN, K.; OLSEN, J.E.; THOMSEN, L.E. Biocide and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolates obtained before and after cleaning at six Danish pig slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 181, p. 53–59, 2014

HUMAYOUN, S. B.; HIOTT, L. M.; GUPTA, S. K.; BARRET, J. B.; WOODLEY, T. A.; JOHNSTON, J. J.; JACKSON, C. R.; FRYE, J. G. An assay for determining the susceptibility of *Salmonella* isolates to commercial and household biocides. **PlosOne**, v. 13, p. :e0209072, 2018.

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**, v. 1, p. 100003, 2019.

LONG, M.; LAI, H.; DENG, W.; ZHOU, K.; LI, B.; LIU, S.; FAN, L.; WANG, H.; ZOU, L. Disinfectant susceptibility of different *Salmonella* serotypes isolated from chicken and egg production chains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 672-681, 2016.

WU, G.; YANG, Q.; LONG, M.; GUO, L.; LI, B.; MENG, Y.; ZHANG, A.; WANG, H.; LIU, S.; ZOU, L. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. **The Journal of Antibiotics**, v. 68, n. 11, p. 661–665, 2015.

ZOU, L.; MENG, J.; MCDERMOTT, P.F.; WANG, F.; YANG, Q.; CAO, G.; HOFFMANN, M.; ZHAO, S. Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, p. 2644–2649, 2014.