



RESISTÊNCIA FENOTÍPICA À CIPROFLOXACINA EM *Salmonella* spp. ISOLADA DE PRODUTOS CÁRNEOS

LUIZ GUSTAVO BACH¹; LETÍCIA KLEIN SCHEIK²; LAÍS ABREU ANASTÁCIO²;
DIEGO PERES ÁVILA²; GRACIELA VOLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA
SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – lugubach@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – leticiascheik@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – laisabr@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – diiperes1@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como sendo um dos maiores importadores e exportadores de proteína animal do mundo, desse modo, a carne é a principal fonte proteica na alimentação brasileira (CONAB, 2019). *Salmonella* spp. é um micro-organismo naturalmente presente no trato intestinal de determinadas espécies de animais, os quais atuam como reservatórios naturais. Sendo assim, alimentos obtidos a partir da carne desses animais, podem conter este patógeno (BAÚ et al., 2001).

A infecção causada por *Salmonella* spp. é chamada de salmonelose e os sintomas mais comuns incluem diarreia, vômito, febre e dores de estômago. Na maioria das vezes a doença é autolimitante, sendo necessária intervenção medicamentosa com antimicrobianos somente em casos mais graves (CDC 2019). No Brasil, *Salmonella* spp. é a segunda maior causa de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), representando 11,3% dos episódios identificados entre 2009 e 2018 (BRASIL, 2019).

O uso indiscriminado de antimicrobianos nos últimos anos resultou em resistência contra vários princípios ativos utilizados no tratamento de salmonelose. Diante disso, o grupo das quinolonas é empregado como primeira escolha na terapêutica de salmoneloses graves e nos casos em que outros medicamentos não são mais eficazes (KLOCHKO, 2019). Um importante exemplo dentro desse grupo é a ciprofloxacina, antimicrobiano de amplo espectro que age impedindo a síntese de DNA bacteriano através da inibição da enzima topoisomerase II (KLOCHKO, 2019).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar fenotipicamente o perfil de resistência ao antimicrobiano ciprofloxacina em *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos da região sul do Rio Grande do Sul.

2. METODOLOGIA

Vinte e sete isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos da região sul do Rio Grande do Sul, analisados no período de janeiro de 2010 a fevereiro de 2019, disponíveis na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial/DCTA/FAEM/UFPEL, foram selecionados para a avaliação fenotípica de resistência à ciprofloxacina.

2.1 Teste de disco difusão em ágar

Os isolados foram submetidos ao teste de disco difusão em ágar seguindo os parâmetros para bactérias da família Enterobacteriaceae, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018). Para realização do teste, os inóculos foram padronizados em solução salina 0,85% de acordo com a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC.mL⁻¹), semeados com auxílio de swab em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH) e, em seguida, foram adicionados discos do antimicrobiano ciprofloxacina (5 µg, Laborclin®). As placas de Petri foram, posteriormente, incubadas por 24 horas a 37 °C. Os halos de inibição originados foram mensurados e os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (2018), sendo considerados suscetíveis (≥ 31 mm), intermediários (21-30 mm) ou resistentes (≤ 20 mm). Utilizou-se, como controle positivo para os testes, a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os isolados que foram classificados como intermediários ou resistentes à ciprofloxacina no teste anterior, foram submetidos ao teste de CIM para quantificação da resistência através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com CLSI (2018). As concentrações do antimicrobiano testadas foram entre 0,25 a 128 µg.mL⁻¹. A CIM foi definida como a menor concentração do composto em que não houve multiplicação bacteriana visível. Os resultados foram interpretados de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CLSI (2018), e os isolados foram considerados suscetíveis ($\leq 0,06$ µg.mL⁻¹), intermediários (0,12-0,15 µg.mL⁻¹) ou resistentes (≥ 1 µg.mL⁻¹) à ciprofloxacina.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos vinte e sete isolados de *Salmonella* spp. oriundos de produtos cárneos, nove (33,3%) apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina no teste de disco difusão em ágar (Tabela 1), com o diâmetro dos halos variando de 22,75 a 30,25 mm. Ressalta-se que essa resistência não ocorreu de forma isolada, pois todos isolados apresentaram também resistência a, no mínimo, três classes de antimicrobianos, sendo então caracterizados como multirresistentes.

Em relação ao teste de concentração inibitória mínima (CIM), os isolados 7, 11, 12 e 19 (44,4%) exibiram valores de CIM de 8 µg.mL⁻¹, enquanto os isolados 8, 9 e 10 (33,3%) obtiveram valores de CIM de 4 µg.mL⁻¹. Além disso, foram observados, nos isolados 13 e 14, valores de CIM de 1 µg.mL⁻¹ e 2 µg.mL⁻¹. Diante dos valores encontrados, todos os isolados foram considerados resistentes à ciprofloxacina.

Resultados similares aos deste estudo foram obtidos por MOAWAD et al. (2017), que avaliaram 180 amostras de frango *in natura* e de carne bovina, sendo 15 delas positivas para *Salmonella* spp., das quais, cinco (33%) apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina.

Por outro lado, PANDINI et al. (2014), isolaram *Salmonella* spp. de 39 amostras (11,4%) de um total de 342 amostras de aviários, sendo todos isolados (100%) suscetíveis à ciprofloxacina. SOUZA et al. (2010) também encontraram 100% de suscetibilidade à ciprofloxacina em isolados obtidos de surtos alimentares causados por *Salmonella* spp..

A presença de resistência bacteriana é um fator preocupante, pelo fato que as bactérias possuem mecanismos de transferência de material genético, como por exemplo, a conjugação. Nesse processo, elas podem transferir plasmídeos

contendo genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou até mesmo entre espécies diferentes, conferindo-lhes resistência (SÁNCHEZ et al., 2012).

Segundo PIDDOCK (2002), o primeiro relato de *Salmonella* spp. resistente à ciprofloxacina ocorreu na Europa, no ano de 1990, e desde então essa resistência tem sido reportada em diversos países. Porém, no presente estudo, todos os isolados que apresentaram resistência a este antimicrobiano foram obtidos no ano de 2018, não sendo identificada essa resistência em isolados de anos anteriores.

Com relação aos sorovares que apresentaram resistência à ciprofloxacina observou-se: *Salmonella* Anatum (55,5%), seguido por *Salmonella* Typhimurium (22,2%), *Salmonella* Heidelberg (11,1%) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:4, 5) (11,1%).

A legislação brasileira vigente estabelece a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001). A presença desse patógeno em produtos cárneos, além de inviabilizar seu consumo, revela risco potencial aos consumidores pela possibilidade de causar infecção alimentar. Além disso, a presença de *Salmonella* spp. resistentes à ciprofloxacina em produtos cárneos defumados, como no caso dos isolados 9, 11 e 12 (Tabela 1) é um dado importante, uma vez que esses alimentos são menos propensos a contaminação devido ao processo de defumação representar uma barreira para a sobrevivência desta bactéria nesses alimentos (GEORGE et al., 2014).

Tabela 1: Características dos isolados de *Salmonella* spp. resistentes à ciprofloxacina, oriundos de produtos cárneos do sul do Rio Grande do Sul

Isolado	Origem	Data	Sorovar	CIM ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
S7	Linguiça mista frescal	Março, 2018	Anatum	8
S8	Linguiça mista frescal	Abril, 2018	Anatum	4
S9	Linguiça defumada	Abril, 2018	Anatum	4
S10	Carne suína; gordura	Abril, 2018	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)	4
S11	Linguiça mista defumada	Abril, 2018	Anatum	8
S12	Linguiça mista seca defumada	Maio, 2018	Heidelberg	8
S13	Linguiça fresca	Junho, 2018	Typhimurium	1
S14	Carne suína crua refrigerada	Junho, 2018	Anatum	2
S19	Linguiça suína	Julho, 2018	Typhimurium	8

4. CONCLUSÕES

Isolados de *Salmonella* spp. oriundos de produtos cárneos da região sul do Rio Grande do Sul apresentam resistência à ciprofloxacina, com valores de CIM variando entre 1 e 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A presença dessa resistência é um problema de saúde pública, haja vista que se tornam limitadas as opções de princípios ativos a ser utilizados para tratamento de salmoneloses graves.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n.2, p. 303-307, 2001
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Acessado em 15 set. 2020. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b.
- BRASIL. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Ministério da Saúde. Acessado em 11 set. 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/imagens/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-SurtosDTA-Maio-2019.pdf>.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Salmonella Infection**. 2019. Acessado em 12 set. 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 28th. CLSI document M100Ed28E. Wayne, PA: CLSI, 2018.
- CONAB. **Perspectivas para a agropecuária- Safra 2019/2020**. Conab, Brasília, v.7, out. 2019. Acessado em 11 set. 2020. Online. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>.
- GEORGE, F.; A. OGBOLU, O. OLAOYE, S. OBASA, A. IDOWU AND D. ODULATE. Fish processing technologies in Nigeria: a case study of Ibeju-Lekki local government area, Lagos State. **American Journal of Food Technology**, v. 9, n. 6, p. 302-310, 2014.
- KLOCHKO, A. **Salmonella Infections (Salmonellosis)**. Medscape. Florida, EUA, 20 dez. 2019. Acessado em 08 set. 2020. Online. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/228174>.
- MOAWAD, A. A.; HOTZEL, H.; AWAD, O.; TOMASO, H.; NEUBAUER, H.; HAFEZ, H. M.; EL-ADAWY, H. Occurrence of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. **Gut pathogens**, v. 9, n. 1, p. 57, 2017.
- PANDINI, J.A.; PINTO, F. G. D. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. D. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, 2015.
- PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 3-16, 2002.
- SÁNCHEZ, P.; MUÑOZ, R.; GUTIÉRREZ, N.P. Resistencia bacteriana a los antibióticos. **Spei Domus**, v. 8, n. 17, 2012.
- SOUZA, R. B.; FERRARI, R. G.; MAGNANI, M.; KOTTWITZ, L.; ALCOCER, I.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 497-500, 2010.