

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DE DOCES CONFEITADOS

ISABELA SCHNEID¹; MARIANA ALMEIDA IGLESIAS²; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – maryanaiglesias@hotmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas - tkvgandra@yahoo.com.br;

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

1. INTRODUÇÃO

A tradição doceira da cidade de Pelotas/RS se deve a colonização portuguesa, que incorporou a prática de produção e consumo de doces de confeitaria. Atualmente, é referência no que diz respeito à produção de doces confeitados, sendo considerada a capital nacional do doce (GRANADA et al., 2003).

Alimentos que sofrem manipulação, como é o caso dos doces confeitados são potencialmente capazes de causar intoxicação estafilocócica e os manipuladores podem ser importantes carreadores de *S. aureus* (NETO et al., 2002).

Além disso, esse micro-organismo patogênico possui a capacidade de se aderir em superfícies e formar biofilme. O biofilme constitui um modo de crescimento que permite proteção destes micro-organismos em ambientes hostis. No preparo de alimentos, os biofilmes bacterianos podem ser uma fonte de contaminação, causando a deterioração dos alimentos, bem como podem veicular bactérias patogênicas, que podem causar casos/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA). As bactérias em biofilmes são difíceis de erradicar devido ao seu fenótipo de resistência (SIMÕES; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

Segundo Donlan e Costerton (2002), o biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e os micro-organismos que crescem em um biofilme são altamente resistentes aos agentes antimicrobianos.

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resistência a antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilme de isolados de *S. aureus* provenientes de doces confeitados.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados cinco isolados de *S. aureus* provenientes de doces confeitados produzidos no sul do Brasil (Bem casado, Ninho e Camafeu) para a avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e para a avaliação da capacidade de formação de biofilme.

2.1 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

Os isolados foram submetidos ao teste de disco difusão, preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012), frente a 12 antimicrobianos: gentamicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), sulfonamida (300µg), ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), penicilina (10 U), cefalotina (30 µg) e cefoxitina (30 µg). Utilizou-se, como controle positivo para os testes, a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Os resultados foram interpretados de acordo com os padrões de diâmetros do halo de inibição para *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2012).

2.2 Avaliação da capacidade de adesão em microplacas

Os isolados foram avaliados em triplicata, quanto a capacidade de adesão, utilizando-se microplacas. Os isolados cultivados em TSA, a 37°C, *overnight*, foram padronizados na escala 0,5 de MacFarland, e 20µL de cada inóculo foram transferidos para três cavidades da microplaca contendo 180µL de TSB 1% glicose para crescimento a 37°C por 24h. Em seguida, cada cavidade foi lavada três vezes com 300µL de PBS para a retirada das células não aderidas, seguido de fixação com metanol. Após a secagem, 150µL de cristal violeta foram adicionados em cada cavidade. As microplacas foram, então, lavadas com água e secas em estufa. Em seguida, 150µL de etanol 95% foram adicionados por 30 min. Após esse tempo, a densidade óptica (DO) a 595nm de cada amostra foi mensurada por espectrofotometria (STEPANOVIC et al., 2007). Como controle negativo foi utilizado TSB e como controle positivo *S. aureus* ATCC 25923.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de resistência e suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* obtidos no antibiograma podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Perfil de resistência/sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de doces confeitados a antimicrobianos

Antimicrobianos	Sensível	Intermediário	Resistente
	% (n)	% (n)	% (n)
Ampicilina (10 µg)	40 (2)	0	60 (3)
Cefalotina (30 µg)	100 (5)	0	0
Cefoxitina (30 µg)	100 (5)	0	0
Ciprofloxacina (5 µg)	100 (5)	0	0
Clindamicina (2 µg)	100 (5)	0	0
Cloranfenicol (30 µg)	100 (5)	0	0
Eritromicina (15 µg)	100 (5)	0	0
Gentamicina (10 µg)	80 (4)	20 (1)	0
Penicilina (10 U)	40 (2)	0	60 (3)
Sulfonamida (300µg)	80 (4)	0	20 (1)
Tetraciclina (30 µg)	100 (5)	0	0
Vancomicina (30 µg)	100 (5)	0	0

Os resultados do presente estudo demonstraram que dos cinco isolados testados, 100% deles mostraram-se sensíveis a maioria dos antimicrobianos, com

exceção de três isolados que apresentaram resistência a penicilina e ampicilina. Esses resultados são interessantes, haja vista que outros autores, como Peles et al. (2007), Pereira et al. (2009) e Gandra et al. (2009), encontraram 100% dos isolados testados resistentes a estes antibióticos.

A resistência a β -lactâmicos, como ampicilina e penicilina, pode estar relacionada tanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos, como a capacidade de algumas cepas de *S. aureus* de produzirem uma barreira de exopolissacarídeo, protegendo a parede celular e dificultando a ação destes antibióticos, o que pode justificar o perfil de resistência dos isolados testados neste estudo.

Os resultados encontrados para a densidade ótica durante a formação de biofilme em microplacas dos isolados de *S. aureus*, estão ilustrados na Figura 1.

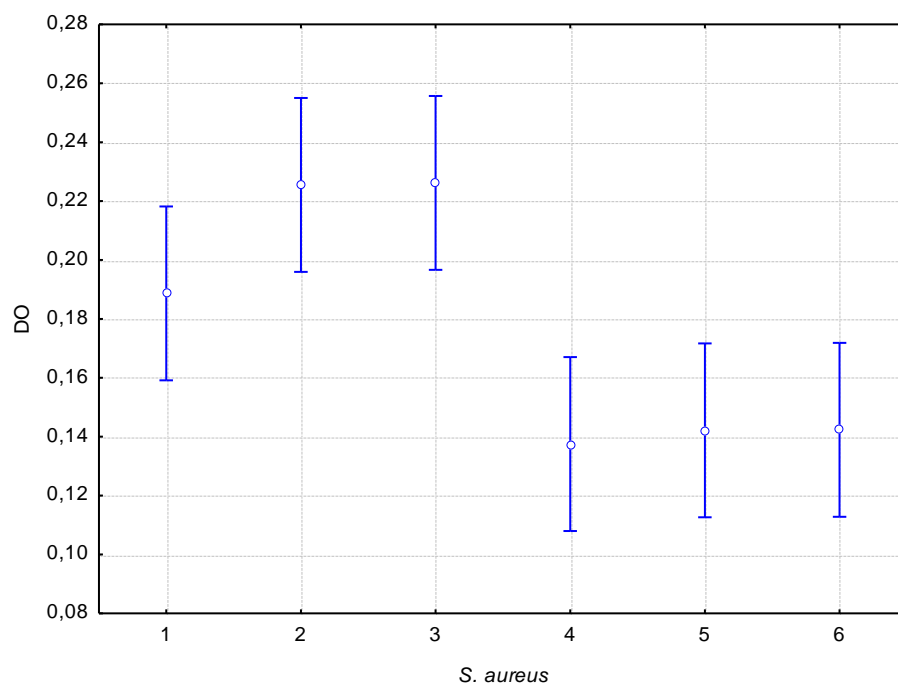


Figura 1: Média da densidade ótica (DO) dos isolados de *S. aureus* (1, 2, 3, 4, e 5) e da cepa *S. aureus* ATCC 25923.

Os isolados 1, 2 e 3 (60%) foram considerados formadores de biofilme, segundo os critérios propostos por Stepanovick (2007). Em relação a estatística (ANOVA, e Tukey), houve diferença significativa entre os isolados ($p < 0,05$).

Os isolados 2 e 3 apresentaram médias de DO significativamente maiores que os isolados 4, 5 e que a cepa padrão. (6). O isolado 1, também considerado formador de biofilme, não apresentou diferença de DO significativa ($p > 0,05$) com os demais isolados. Dessa forma pode-se inferir que os isolados 2 e 3 são significativamente mais formadores de biofilme que os demais isolados testados.

Melo (2008), ao analisar a produção de biofilme pela aderência em microplacas de isolados de *S. aureus*, demonstrou que 98,9% dos isolados se aderiram à placa e foram considerados produtores de biofilme. Vasudevan et al. (2003), utilizando a mesma técnica, encontraram 68,57% dos isolados produtores de biofilmes.

4. CONCLUSÕES

A presença de *S. aureus* em amostras de doces confeitados é uma preocupação para a indústria doceira, tendo em vista que os isolados avaliados

apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano e ainda apresentaram capacidade de formar biofilme, assim, além de poder ocasionar contaminação cruzada no processo de fabricação, podem ser potencial perigo à saúde pública.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved standard - Eleventh Edition*. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. Ciênc. e Tecnol. Aliment.*, Campinas, 22(3), 263-271, set-dez. 2002.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, n.2, p.167- 193, 2002.
- GANDRA, T. K. V., OLIVEIRA, M. G., BASANI, M. T., SILVA, W.P. Perfil de resistência/sensibilidade a antibióticos em cepas de Estafilococos coagulase positiva isoladas em embutidos e de queijos. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 2009.
- GRANADA, G.G., MENDONÇA, C.R.B., PORTO, C., ROSA, F., SILVA, E., SILVA, W.P., KOETZ, P. R., ZAMBIAZI, R.C. Perfil higiênico-sanitário de quindins comercializados em Pelotas/RS. *Alimentos e Nutrição*, v.14, n.1, p.57-61, 2003.
- Hungary. *International Journal of Food Microbiology*, v. 118, p. 186–193, 2007.
- MELO, P.C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina**. 2008. 122 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo.
- PELES, F.; WAGNER, M.; VARGA, L.; HEIN, I.; RIECK, P.; GUTSER . K.; KERESZTURI, P.; KARDOS, G.; TURCSÁNYI, I.; BÉRI, B.; SZABÓ, A. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine milk in Hungary. *Int J Food Microbiol.* Sep 15; 186-93.2007.
- PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J; GIBBS,P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, p. 1–5, 2009.
- SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C., VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **Food Science and Technology**, 43, 573–583, 2010.
- STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.;RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, 891–9, 2007.
- VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K.S. Phenotypic and Genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**. v. 92 p. 179-185, 2003.