

## AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE USO CLÍNICO DE ISOLADOS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS PROVENIENTES DE DIFERENTES MATRIZES ALIMENTARES

PEDRO FERNANDES VIANA<sup>1</sup>, MARIA FERNANDA FERNANDES SIQUEIRA<sup>2</sup>, CAROLINE KRAUSE BIERHALS<sup>3</sup>, KHADIJA BEZERRA MASSAUT<sup>4</sup>, GRACIELA VOLZ LOPES<sup>5</sup>, ÂNGELA MARIA FIORENTINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – fernandes199921@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – maria.fernanda.fs97@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – carolinebierhals@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – khadijamassaut@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – gracielavlopes@yahoo.com.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser isoladas de vários produtos alimentares de origem animal e vegetal (MARGALHO *et al.*, 2020), possuem características distintas e são classificadas como Gram-positivas, catalase negativa e produzem ácido lático como produto final da fermentação de carboidratos (LEVIT *et al.*, 2020).

A busca por novas cepas de bactérias com potencial probiótico e a investigação de seu comportamento fermentativo, despertam considerável interesse, devido ao potencial uso das mesmas na produção de alimentos e na promoção da saúde da população (WAN *et al.*, 2018). Contudo, mesmo que as BAL são consideradas GRAS (Geralmente Reconhecidas como Seguras), conforme estabelecido pela ANVISA (2021) as BAL precisam passar por avaliação de segurança microbiológica, antes de sua utilização em alimentos.

Os testes de segurança microbiológica investigam a presença de fatores de virulência, constatando se o isolado apresenta um perfil patogênico indesejável para a sua aplicação em alimentos. Dentre esses fatores, incluem-se a resistência a certos antimicrobianos de uso clínico, bem como a presença de enzimas extracelulares, como a DNase, gelatinase e hemolisina (EATON; GASSON, 2001).

Nas análises laboratoriais, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos desempenha um papel fundamental, pois é considerada uma avaliação essencial para determinar a sensibilidade dos microrganismos a diferentes agentes antimicrobianos (JORGENSEN, FERRERO, 1998). O mecanismo de resistência bacteriana aos antimicrobianos pode se apresentar de forma intrínseca é aquela que está naturalmente presente no genoma da espécie, como também de maneira adquirida, que pode surgir por meio de mutações em genes já existentes ou pela aquisição de novo material genético, como plasmídeos, transposons e bacteriófagos (HOLLENBECK, RICE, 2012).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico de isolados de BAL, provenientes de diversas fontes alimentares.

### 2. METODOLOGIA

A metodologia empregada para os testes de suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico foi adaptada do protocolo proposto pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), onde as culturas ativas foram padronizadas quanto a sua turbidez seguindo a escala 0,5 de *Mc farland* em

solução salina 0,85% – que corresponde, aproximadamente, a  $1,5 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>.

Uma vez ajustada a turbidez, inoculam-se os cultivos em placas contendo 10 mL de ágar Mueller Hinton (MH) com o auxílio de um *swab* esterilizado. Depois de inoculados, aplicaram-se discos dos antimicrobianos sobre as placas, que foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Dentre os antimicrobianos que foram testados estão ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 g), ampicilina (10 µg), tetraciclina (30 g) e vancomicina (30 µg).

Os resultados foram classificados de acordo com o tamanho da zona de inibição formada, como resistentes (R, ≤ 15 mm), com sensibilidade intermediária (I, 16-20 mm) ou sensíveis (S, ≥ 21 mm), (VIKOVÁ *et al.*, 2006).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 32 isolados procedentes de diferentes matrizes alimentares (leite de cabra *in natura*, mel, levain, bagre, corvina, camarão e amido de batata) passaram para a avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico. Os resultados da avaliação de suscetibilidade a diferentes antimicrobianos dos isolados de bactérias ácido-láticas estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1** - Resultados da avaliação de suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados de bactérias ácido-láticas de diferentes matrizes alimentares

| Antimicrobianos | Número de isolados   |                          |                    |
|-----------------|----------------------|--------------------------|--------------------|
|                 | Resistente (≤ 15 mm) | Intermediário (16-20 mm) | Sensível (≥ 21 mm) |
| Ciprofloxacina  | 3                    | 9                        | 20                 |
| Cloranfenicol   | 4                    | 2                        | 26                 |
| Eritromicina    | 18                   | 0                        | 14                 |
| Gentamicina     | 6                    | 8                        | 18                 |
| Penicilina      | 4                    | 4                        | 24                 |
| Ampicilina      | 1                    | 0                        | 31                 |
| Tetraciclina    | 13                   | 2                        | 17                 |
| Vancomicina     | 15                   | 0                        | 17                 |

Fonte - Autores, 2023.

Os resultados obtidos revelam que a maioria dos isolados apresentaram sensibilidade a sete dos oito antimicrobianos avaliados, sendo a ampicilina com a maior porcentagem de suscetibilidade (96,87%), seguido do cloranfenicol (81,25%), penicilina (75,0%), ciprofloxacina (62,5%), gentamicina (56,25%) tetraciclina (53,12%), vancomicina (53,12%) e, em contrapartida, a eritromicina foi o antimicrobiano com o menor percentual de suscetibilidade (43,75%) e com o maior percentual de resistência (56,25%), seguida da vancomicina (46,87%), e tetraciclina (40,62%). Dentre os 32 isolados apenas 5 (15,6%) dos isolados demonstraram suscetibilidade aos antimicrobianos, tornando-os adequados para testes subsequentes.

A utilização de muitos antimicrobianos sem a orientação de um profissional de saúde, ou seja, por meio da automedicação, está ligada à incidência crescente da resistência antimicrobiana. Esta prática, por sua vez, contribui significativamente para o desenvolvimento de bactérias que adquirem resistência aos medicamentos antibióticos, originando assim um ciclo prejudicial contínuo

(GRIGORYAN *et al.*, 2006). Num contexto de aplicação alimentícia, é de suma importância que os isolados demonstrem suscetibilidade aos antimicrobianos (DIAS, 2015), uma vez que essa resistência, se não for intrínseca, poderia ser transmitida aos demais microrganismos presentes na microbiota humana (CLSI, 2015).

Quanto a alta resistência a eritromicina, esta pode ser explicada pelo fato de que os plasmídeos de resistência a este antibiótico são geralmente encontrados em cepas de BAL do gênero *Enterococcus* (MURRAY, 1990 *apud* DE PAULA, 2014), demonstrando que os isolados do presente estudo que apresentaram resistência a eritromicina (e também a outros antimicrobianos avaliados), podem apresentar a presença de plasmídeos, sendo necessário realização de análise de perfil plasmidial, uma vez que genes de resistência aos antimicrobianos pode estar presente neste elemento genético móvel.

Por outro lado, em nosso estudo, observamos que a maioria das amostras isoladas demonstrou suscetibilidade à ampicilina, com uma taxa de 96,87%. O que difere do experimento conduzido por Zanetti *et al.* (2022), onde testes utilizando ampicilina foram realizados, resultando em 50% das cepas manifestando resistência.

A resistência à vancomicina e gentamicina nos isolados é esperada devido à resistência intrínseca em algumas espécies de BAL a esses antimicrobianos. Essa resistência não é motivo de grande preocupação, pois está incorporada no material genético cromossômico das bactérias, dificultando a transferência de genes de resistência para outros microrganismos (SWENSON E THORNSBERRY, 1990; MORROW *et al.*, 2012).

#### 4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o número de isolados suscetíveis a todos os antimicrobianos avaliados foi relativamente baixo, em relação ao número total de isolados testados, indicando que a seleção de bactérias ácido-láticas deve ser criteriosa e passar por uma investigação contínua. A resistência antimicrobiana aumenta com o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, é um problema crescente que deve ser levado em conta na saúde pública, na produção animal e agrícola, para garantir a segurança microbiológica como um todo.

Agradeço ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia Para Instrução Processual De Petição De Avaliação De Probióticos Para Uso Em Alimentos**. ALIMENTOS - GUIA nº 21, versão 2, de 06 de junho de 2021. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2021.
- BARBOSA, J. *et al.* Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. **Food Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 527–532. 2009.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2020.
- CLSI. Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing Systems. 1st ed. CLSI guideline M52. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

- DE PAULA, M. C. Avaliação do risco da ocorrência de resistência a antibióticos e/ou bacteremia causadas por bactérias ácido lácticas: uma revisão sistemática. 2014, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- DIAS, M. R. S. **Avaliação das propriedades funcionais de bactérias lácticas isoladas de leite cru de ovelha**. 2015, Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2015.
- DOMINGOS-LOPES, M. F. P.; STANTON, C.; ROSS, P. R.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiol**, 2017.
- EATON, T. J. & GASSON, M. J. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1628-1635. 2001.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. **Virulence**, 2012.
- JAWETZ, E. *et al.* Microbiologia Médica. ed. **Guanabara Koogan**, 524p., 2001.
- JORGENSEN, J. H.; FERRERO, M. J. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. **Clin. Infect. Dis.**, 26: 973-80, 1998.
- KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. **Indian Journal of Medical Research**, v.121, p.83-91, 2005.
- LEVIT, R.; SAVOY G. G.; MORENO L. A.; LEBLANC, J. G. Recent update on lactic acid bacteria producing riboflavin and folates: application for food fortification and treatment of intestinal inflammation. **Journal of Applied Microbiology**, v.130, n.5, p.1412-1424, 2021.
- MARGALHO, L. P. *et al.* Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties — Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, 2020.
- MORROW, L. E. *et al.* Probiotics in the intensive care unit. **Nutrition in Clinical Practice**, v.27, n.2, p.235-241, 2012.
- NORMARK, H., NORMARK S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, v.252, n.2, p.91-106, 2002.
- MURRAY, B.E. The Life and Times of the Enterococcus. **Journal of Clinical Microbiology**, v.3, p.46–65, 1990.
- SWENSON, J. THORNSBERRY, C. F. R. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. **Antimicrob Agents Chemother**, 34(4), 543–549, 1990.
- VIKOVÁ, E. *et al.* Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. **Livestock Science**, 105, 253–259. 2006.
- WAN, M. L. Y., *et al.* Targeting gut microbiota in hepatocellular carcinoma: probiotics as a novel therapy. **Hepatobiliary surgery and nutrition**, v. 7, n. 1, p. 11, 2018.
- ZANETTI, V. C. *et al.* Susceptibilidade a antimicrobianos de cepas potencialmente probióticas isoladas de queijo colonial artesanal. *In: Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia*, 28 - On-line, 2022. Disponível em: <https://eventos.congresse.me/cbcta-2022>