

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA AO HIPOCLORITO DE SÓDIO POR ISOLADOS DE *ACINETOBACTER* SP. ORIUNDOS DE PRODUTOS LÁCTEOS E DE SALADAS PRONTAS PARA O CONSUMO

R.C.R. Malta¹, C.H.S. Cruz¹, E.F.N. Cruz¹, G.L.P.A. Ramos², A.G.M. Gonzalez², J.S. Nascimento¹

1- Departamento de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – CEP: 20270-021 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil, Telefone 55 (21)2566-7792 – e-mail: (janaina.nascimento@ifrj.edu.br).

2 - Departamento de Bromatologia - Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Farmácia – CEP: 24241-001- Niterói - RJ – Brasil, Telefone 55 (21) 2629-9601 – e-mail: (gustavoanciens@gmail.com).

RESUMO - O hipoclorito de sódio é um sanitizante empregado frequentemente em indústrias de alimentos e serviços de alimentação. *Acinetobacter* sp., além de ser conhecido como importante patógeno clínico, têm sido isolado de diversos alimentos, carreando muitas vezes resistência a antibióticos. Este trabalho teve por objetivo avaliar a tolerância ao hipoclorito de sódio por isolados de *Acinetobacter* sp. oriundos de lácteos e de saladas prontas para consumo. Somente um dos 22 isolados testados foi sensível à concentração de hipoclorito recomendada pela legislação vigente para sanitização. Isolados oriundos de saladas foram mais tolerantes ao sanitizante do que aqueles isolados de lácteos. A influência da matéria orgânica na ação do hipoclorito variou de acordo com a origem dos isolados. Os resultados sugerem que o hipoclorito, nas concentrações recomendadas, pode não ser tão eficiente contra *Acinetobacter* sp., e que fatores como a produção de biofilme, que contribuem para esses altos níveis de tolerância, necessitam ser estudados.

ABSTRACT - Sodium hypochlorite is a sanitizer used frequently in the food industries and food service. *Acinetobacter* sp., in addition to being known as an important clinical pathogen, has been isolated from several types of food, often carrying antibiotic resistance. This work aimed to evaluate the tolerance to sodium hypochlorite by isolates of *Acinetobacter* sp. from dairy products and salads ready for consumption. Only one of the 22 isolates tested was sensitive to the concentration of hypochlorite recommended by current legislation for sanitation. Isolates from salads were more tolerant to the sanitizer than those from dairy products. The influence of organic matter on the action of the hypochlorite varied according to the origin of the isolates. The results suggest that hypochlorite, at the recommended concentrations, may not be as efficient against *Acinetobacter* sp., and that factors such as biofilm production, which contribute to these high levels of tolerance, need to be studied.

PALAVRAS-CHAVE: hipoclorito de sódio, *Acinetobacter* sp., tolerância, saladas prontas para consumo, leite de cabra cru.

KEYWORDS: sodium hypochlorite, *Acinetobacter* sp., tolerance, salads ready for consumption, raw goat milk.

1. INTRODUÇÃO

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



Acinetobacter spp. é comumente associado a infecções adquiridas em ambientes hospitalares, e acometem principalmente, o trato intestinal, a pele e a corrente sanguínea (Gordon e Wareham, 2010). Em grande parte dessas infecções, há o envolvimento de *A. baumannii*, espécie que tem representado uma grande preocupação ao longo dos anos devido à seus mecanismos de resistência à diversos tipos de antibióticos, a sua patogenicidade e sua capacidade de sobrevivência em ambientes secos e com pouca disponibilidade de nutrientes (Almasaudi, 2018).

Os alimentos são considerados grandes vetores de contaminação por bactérias Gram negativas como *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* Atualmente, vários estudos têm relatado a incidência de *Acinetobacter sp.* resistentes a antibióticos em alimentos como vegetais (maçãs, melões, alfaces) e produtos de origem animal (leite e derivados, frango, carne bovina). Alimentos oferecidos em hospitais a pacientes internados também podem ser potenciais fontes de contaminação por *Acinetobacter spp.* (Dhougari et al., 2011; Araújo et al., 2015; Carvalheira et al., 2017a; Carvalheira et al., 2017b).

Uma das atividades mais desafiadoras na produção, processamento ou distribuição de qualquer alimento é a garantia das condições sanitárias, uma vez que boa parte dos alimentos possui alta disponibilidade de nutrientes, o que favorece o crescimento microbiano (Cleto et al., 2012). A ausência ou a ineficácia da sanitização das superfícies de preparo e até dos próprios alimentos, como no caso de saladas, pode levar à disseminação de bactérias que quando ingeridas podem acarretar em doenças, especialmente, em pacientes imunocomprometidos.

Vale ressaltar que mesmo o emprego correto de sanitizantes conforme preconizado pelas legislações vigentes não garante a eliminação completa de bactérias patogênicas. Atualmente, muitas estirpes apresentam grande tolerância a diferentes agentes sanitizantes, da mesma forma que apresentam resistência a antibióticos (Capita et al., 2019).

Este trabalho visa investigar a tolerância ao hipoclorito de sódio, um dos agentes sanitizantes mais utilizados, por isolados de *Acinetobacter sp.*, resistentes e não-resistentes a antibióticos, oriundos de produtos lácteos (leite de cabra cru e queijos) e de saladas prontas para consumo, de modo a determinar sua eficácia contra esse patógeno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolados Bacterianos

Os isolados de *Acinetobacter sp.* utilizados neste trabalho são exibidos na Tabela 1 e foram identificados por espectrometria de massas (MALDI-TOF). Os isolados são oriundos de produtos lácteos e de saladas prontas para consumo, provenientes de estudos anteriores realizados no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ) e na Universidade Federal Fluminense (UFF).

Os isolados foram ativados a partir do estoque a -20 °C em caldo tripton de soja com glicerol a 40% por meio de inoculação em placas de ágar tripton de soja, que foram incubadas, então, a 37°C por 18 a 24h.

Tabela 1: Isolados de *Acinetobacter sp.* utilizados para avaliação de tolerância à hipoclorito de sódio

Isolados	Identificação	Características relevantes	Origem/ Fonte
405	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	KPC+, ESBL+	
1701	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	Leite de cabra cru (Ramos e Nascimento, 2019)
1708	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	
1715	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	
1716	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	



1717	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	
1718	<i>Acinetobacter guillauiae</i>	KPC+, ESBL+	
2008	<i>Acinetobacter ursingii</i>	ESBL+	
2017	<i>Acinetobacter ursingii</i>	KPC+, ESBL+	
F4R11/4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-	
F3R14/6	<i>Acinetobacter bereziniae</i>	R	
F4R15/7	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	-	
F4R15/6	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	R	
F4R15/3	<i>Acinetobacter nosocomialis</i>	MDR	
F3R18/7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Saladas prontas para o consumo (Beltrão, 2019)
F2R13/7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
F3R7/7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
F2R5/4	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	-	
F1R5/5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
F3R5/3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	
Q2C(b1)	<i>Acinetobacter</i>	MDR	Queijos artesanais (Dados ainda não publicados)
Q2c(b3)	<i>Acinetobacter spp.</i>	R	

ESBL⁺: isolado produtor de beta-lactamases de espectro estendido. KPC⁺: isolado produtor de carbapenemases. R: resistente a antibióticos. MDR (*multidrug resistant*): multirresistente a antibióticos.

2.2 Avaliação da Tolerância ao Hipoclorito de Sódio

A tolerância dos isolados de *Acinetobacter sp.* ao hipoclorito de sódio foi verificada a partir da adaptação do método proposto por Machado et al. (2010). Os isolados de *Acinetobacter sp.* foram crescidos em ágar triptona de soja a 37 °C por 18 h. As culturas foram suspensas em solução salina até a obtenção da turvação 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Em seguida, foram realizadas mais duas diluições, de modo a obter a concentração aproximada de 10^6 UFC/mL. A partir de solução de hipoclorito de sódio a 5% (50.000 ppm de cloro ativo), foram feitas soluções diluídas, de 100 a 20.000 ppm, em água destilada estéril.

Foram adicionados 180µL de cada concentração em duplicata nos poços das placas de microtitulação, e posteriormente dois microlitros da suspensão de células de *Acinetobacter spp* foram adicionados em cada poço. Após exposições de 5, 10 e 15 minutos, 10µL das suspensões foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo triptona de soja. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas e a leitura visual foi realizada por, pelo menos, dois observadores. A turvação nos tubos após o período de incubação é indicativo da presença de micro-organismos tolerantes àquela concentração de sanitizante, segundo a Portaria 101 de 1993 do MAPA (Brasil, 1993).

Para se verificar a influência de matéria orgânica na ação do hipoclorito de sódio, foi realizado um experimento em paralelo, sob as mesmas condições anteriores, porém adicionando-se aos poços com o sanitizante 20µL de uma solução de gelatina a 5%. Para cada duplicata de cada experimento, foram utilizados controles negativos (sem a adição de bactérias) e controles positivos (sem a adição de sanitizante). Os controles positivos tiveram uma alíquota removida no tempo zero de incubação, que foi submetida à quantificação, para confirmação da concentração bacteriana adicionada à cada poço.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

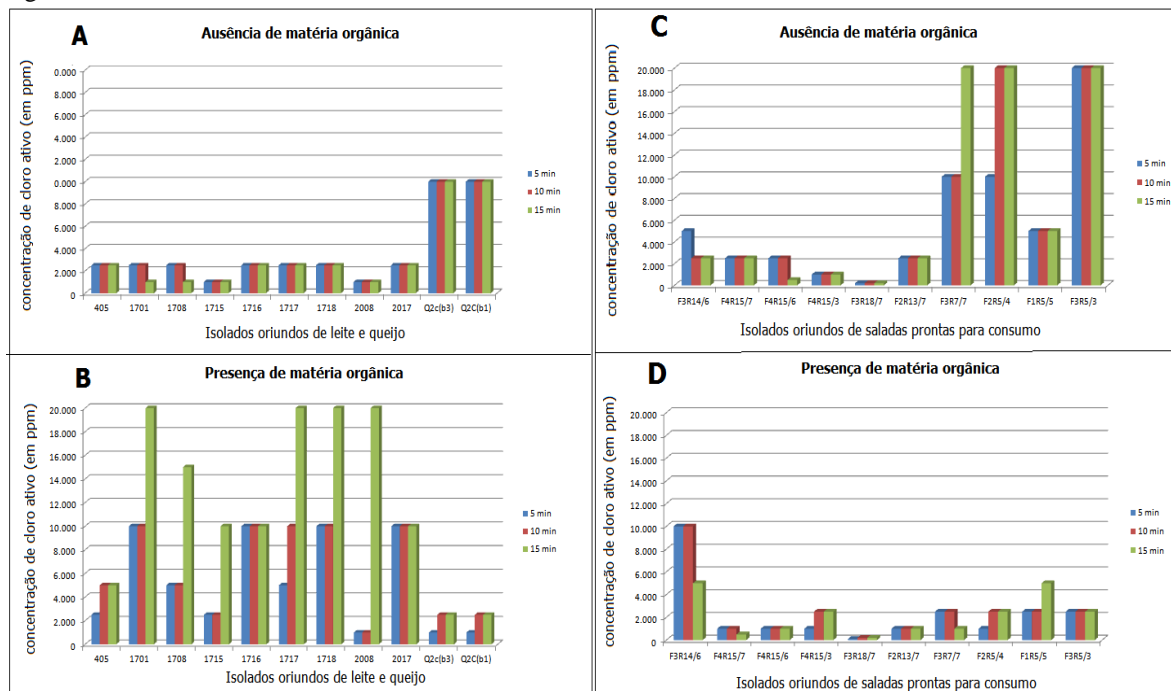
A contaminação dos alimentos por agentes microbianos tem levado a indústria e estabelecimentos comerciais a utilizar cada vez mais agentes sanitizantes em sua rotina. Estes agentes são essenciais para o controle sanitário do ambiente, desde que sua utilização esteja ocorrendo de maneira adequada, principalmente no que concerne a concentração e ao tempo correto de ação do

produto (Kawamura-Sato et al, 2008). Segundo Chapman (2003), a utilização de uma concentração acima da mínima letal é proposital, pois, teoricamente, os micro-organismos não resistiriam a esta concentração. Entretanto, é observado que, quando expostas a estes níveis elevados, algumas bactérias são capazes de adquirir ou alterar algumas características fenotípicas e genotípicas relacionadas à tolerância.

O hipoclorito de sódio é um dos agentes sanitizantes mais utilizados. É um composto oxidante que reúne duas importantes características: o seu amplo espectro de ação e seu baixo custo. Seu principal modo de ação consiste em danificar a membrana celular bacteriana, produzindo uma perda do controle da permeabilidade e eventual lise da célula (Mørretrø e Langsrud, 2017; Capita et al., 2019).

Segundo Babaei et al. (2015), há muitos estudos que buscam demonstrar a susceptibilidade do *A. baumannii* a antibióticos, porém a literatura é escassa com relação a publicações que demonstrem a susceptibilidade do *A. baumannii* a desinfetantes e antissépticos. Dos 22 isolados testados, apenas um deles (F3R18/7), oriundo de salada pronta pra consumo, foi sensível à concentração de 100 ppm de cloro ativo recomendada pela legislação vigente (Brasil, 1993). Foi observado que, em geral, os isolados provenientes de saladas prontas para o consumo mostraram-se mais tolerantes ao hipoclorito do que aqueles provenientes de amostras de leite, como indicado na Figuras 1A e 1C. Embora não seja possível afirmar, sugere-se que esse fato possa ter alguma relação ao contato prévio dos isolados ao sanitizante, durante a higienização dos vegetais. Na área clínica, fatos como esse já foram verificados. Suwantarat et al. (2014) identificaram isolados de *A. baumannii* tolerantes a um sanitizante em pacientes de um hospital que tomavam banhos todos os dias com a solução asséptica alvo do estudo, sugerindo que as bactérias adquiriram a tolerância após a exposição continuada.

Figura 1: Tolerância dos isolados de *Acinetobacter* sp. às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio utilizadas após exposição por 5, 10 e 15 minutos. A: isolados oriundos de leite de cabra e queijo na ausência de matéria orgânica. B: isolados oriundos de saladas na ausência de matéria orgânica. C: isolados oriundos de leite de cabra e queijo na presença de matéria orgânica. D: isolados oriundos de saladas na presença de matéria orgânica.



27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

Alguns isolados de *Acinetobacter* sp. foram tolerantes a concentrações muito altas (entre 10.000 e 20.000 ppm) de hipoclorito de sódio. Este fenômeno é descrito na literatura, em especial, para estirpes formadoras de biofilme. Já foi relatada a tolerância a concentrações de até 20.000 ppm de hipoclorito por estirpes de *Staphylococcus aureus* (Almatroudi et al., 2016) e de até 50.000 ppm por estirpes de *Salmonella* sp. (Capita et al., 2019) presentes em biofilme.

A influência de matéria orgânica sobre a eficácia do hipoclorito de sódio contra os isolados de *Acinetobacter* sp. também foi investigada. Os resultados deste trabalho sugerem que a presença de matéria orgânica pode interferir significativamente na eficácia do hipoclorito de sódio. Entretanto, essa interferência variou conforme a origem dos isolados testados. No caso dos isolados provenientes de saladas, verificou-se que, de maneira geral, a presença da matéria orgânica aumentou a eficácia do agente (**Figura 1D**), enquanto que para nove dos 11 isolados de lácteos, houve redução da eficiência antimicrobiana (aumento da tolerância), conforme esperado (**Figura 1B**).

Esse tipo de interferência também foi observado por Camilotti et al. (2015), que relatam que a matéria orgânica utilizada (albumina sérica bovina) influenciou na atividade do cloreto de benzalcônio contra estirpes de *Salmonella* isoladas de carcaça de frango. Os autores observaram que quanto maior a concentração de matéria orgânica, maior a interferência. No entanto, verificaram que quanto maior a concentração do desinfetante, menor a interferência. Adikesavalu et al. (2015), utilizando caldo triptona de soja como matéria orgânica, também verificaram que a eficácia de diferentes sanitizantes contra estirpes de *Edwardsiella tarda* foi menor na presença desse meio de cultura.

4. CONCLUSÕES

Somente um dos 22 isolados testados foi sensível à concentração de hipoclorito recomendada pela legislação vigente para sanitização. Isolados oriundos de saladas foram mais tolerantes ao sanitizante do que aqueles isolados de produtos lácteos. Os resultados sugerem que o hipoclorito, na concentração recomendada (100 ppm), pode não ser tão eficiente contra *Acinetobacter* sp., e que fatores como a produção de biofilme, que contribuem para esses altos níveis de tolerância, necessitam ser estudados.

5. REFERÊNCIAS

- Adikesavalu, H., Kumar, P., Abraham, T. J. & Uma, A (2015). Minimal bactericidal concentration of sanitizers against *Edwardsiella tarda* strains isolated from african catfish *Clarias gariepinus*. *Journal of Marine Biosciences*, 1, 5-10.
- Almasaudi, S. B. (2018). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. *Saudi Journal of Biological sciences*, 25(3), 586-596.
- Almatroudi, A., Gosbell, I. B., Hu, H., Jensen, S. O., Espedido, B. A., Tahir, S., Glasbey, T.O., Legge, P., Whiteley, G., Deva, A. & Vickery, K. (2016). *Staphylococcus aureus* dry-surface biofilms are not killed by sodium hypochlorite: implications for infection control. *Journal of Hospital Infection*, 93(3), 263-270.
- Araújo, B. C., Moraes, M. S., Costa, L. E. O., & Nascimento, J. S. (2015). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex isolated from infant milk formula and utensils in a nursery in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of dairy science*, 98(4), 2303-2306.
- Babaei, M. R., Sulong, A.; Hamat, R. A., Nordin, S. A., & Neela, V. K. (2015). Extremely high prevalence of antiseptic resistant Quaternary Ammonium Compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(11), 1-5.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



- Beltrão, J. C. C. (2019). *Avaliação da qualidade microbiológica de saladas e hortaliças cruas prontas para consumo e identificação do perfil de resistência a antibióticos das enterobactérias*. (Dissertação de mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói.
- Brasil, Ministério da Pecuária e Abastecimento. (1993). *Métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes - métodos microbiológicos* (Portaria nº 101, de 11 de agosto de 1993). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Camilotti, E., Rocha, S. L. S., Tejkowski, T. M., Moraes, H. L. S., Salle, C. T. P., & Avancini, C. A. M. (2015). Simulação de condições de uso de quaternário de amônio frente amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 16(1), 66-72.
- Capita, R., Fernández-Pérez, S., Buzón-Durán, L., & Alonso-Calleja, C. (2019). Effect of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride on the structural parameters of the biofilms formed by ten *Salmonella enterica* serotypes. *Pathogens*, 8(3), 154.
- Carvalho, A., Casquete, R., Silva, J., & Teixeira, P. (2017a). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*, 243, 58-63.
- Carvalho, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2017b). Lettuce and fruits as a source of multidrug resistant *Acinetobacter* spp. *Food Microbiology*, 64, 119-125.
- Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 271-276.
- Cleto S., Matos S., Kluskens L., & Vieira M.J. (2012). Characterization of Contaminants from a Sanitized Milk Processing Plant. *PLoS ONE* 7(6), e40189.
- Gordon, N. C., & Wareham, D. W. (2010). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 219-226.
- Kawamura-Sato, K., Wanchino, J., Kondo, T., Ito, H., & Arakawa, Y. (2008). Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 568-576.
- Machado, T. R. M., Malheiros, P. D. S., Brandelli, A., & Tondo, E. C. (2010). Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69(4), 475-481.
- Møretrø, T., & Langsrud, S. (2017). Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 1022-1041.
- Ramos, G. L. P. A., & Nascimento, J. S. (2019). Characterization of *Acinetobacter* spp. from raw goat Milk. *Ciência Rural*, 49(10), Epub.
- Suwantarat, N., Carroll, K. C., Tekle, T., Ross, T., Maragakis, L. L., Cosgrove, S. E., & Milstone, A. M. (2014). High Prevalence of Reduced Chlorhexidine Susceptibility in Organisms Causing Central Line-Associated Bloodstream Infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(9), 1183-1186.