

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR ESPÉCIES DE *LISTERIA* SP. ISOLADAS DE AMOSTRAS DE ALIMENTOS

D.L. Caurio¹, L. Dornelles¹, A.S. Motta¹

1- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde – CEP: 90050-170– Porto Alegre – RS – Brasil, Telefone: (51) 3308-4111 – e-mail: (amanda.motta@ufrgs.br)

RESUMO - Nos últimos anos observa-se um aumento nos relatos de doenças transmitidas por alimentos. As bactérias por estarem difusas no meio ambiente favorecem a contaminação dos alimentos. Este estudo teve o objetivo de investigar espécies de *Listeria* sp. a partir de amostras de alimentos e avaliar o potencial de formação de biofilme e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. O trabalho identificou 3 espécies do gênero *Listeria* sp.: *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*. Verificou-se que as espécies testadas apresentaram a capacidade moderada de formação de biofilmes. Quanto a susceptibilidade aos antibióticos, 12 (80%) espécies apresentaram um perfil de resistência a pelo menos um antibiótico. Este trabalho observou o potencial risco para os consumidores de alimentos contaminados com espécies formadoras de biofilme. A implementação das Boas Práticas de Fabricação, com processos de higienização precisos são indispensáveis para evitar a presença de bactérias patogênicas em ambientes de processamento dos alimentos.

ABSTRACT - In recent years there has been an increase in reports of foodborne diseases. The bacteria, being diffuse in the environment, favor food contamination. This study aimed to investigate species of *Listeria* sp. from food samples and evaluate the potential for biofilm formation and the susceptibility profile to antimicrobials. The work identified 3 species of the genus *Listeria* sp.: *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. seeligeri*. It was found that the tested species had a moderate capacity for biofilm formation. As for susceptibility to antibiotics, 12 (80%) species showed a resistance profile to at least one antibiotic. This study noted the potential risk for consumers of food contaminated with biofilm-forming species. The implementation of Good Manufacturing Practices, with precise hygiene processes are essential to avoid the presence of pathogenic bacteria in food processing environments.

PALAVRAS-CHAVE: adesão; patógeno; alimento; psicrotrófico; fiambreteria

KEYWORDS: adherence; pathogen; food; psychrotrophic; cold cuts

1. INTRODUÇÃO

O aumento na frequência de doenças transmitidas por alimentos tem sido relatado nos últimos anos (Skowron, 2019; Pasonen, 2019). As bactérias por serem microrganismos difundidos no meio ambiente, favorecem a contaminação de muitos produtos alimentícios, e os Laboratórios de Fiambreteria, que manipulam produtos de origem animal prontos para consumo são ambientes importantes de serem estudados considerando o risco da permanência de bactérias em superfícies e bancadas de processamento (Sauders, 2016).

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br



Listeria sp. é um bacilo Gram-positivo, não esporulado, anaeróbio facultativo, que possui ótima capacidade de crescimento em temperaturas de 2,5°C a 44°C, bem como a pH entre 6,0 e 8,0 e tolera diferentes concentrações de sal (Skowron, 2019). Dezesete espécies são hoje conhecidas, como *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, *L. weihenstephanensis*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. cornellensis*, *L. riparia*, *L. grandensis*, *L. booriae*, *L. newyorkensis* (Orsi, 2016). A *Listeria monocytogenes* representa uma das principais preocupações em alimentos de origem animal, isso devido à sua alta taxa de mortalidade, especialmente para indivíduos imunocomprometidos (Costanzo, 2020). A capacidade de persistência deste microrganismo deve-se a habilidade em aderir-se a áreas de processamento e formar biofilme em superfícies (Galié, 2018).

O termo biofilme é definido como uma comunidade estruturada de células bacterianas, dentro de uma matriz polimérica microbiana, aderida a uma superfície (Galié, 2018), conferindo proteção a bactéria (Fagerlund, 2020). Biofilmes são mais resistentes do que as células em seu estado planctônico, podendo sobreviver aos processos de sanitização e a alta concentração de antimicrobianos. A presença destes biofilmes em superfícies de contato com alimentos pode impactar negativamente na segurança dos produtos (Zetzmann, 2019). Diante disto o presente trabalho objetivou estudar espécies de *Listeria* sp. isoladas a partir de amostras de alimentos e avaliar o potencial de formação de biofilme, bem como o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagens de *Listeria* sp. e condições de cultivo

Neste trabalho foram estudadas 15 bactérias do gênero *Listeria* sp. Destas bactérias 13 foram isoladas em trabalho anterior a partir de amostras de produtos de origem animal fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambria em Porto Alegre – RS e 2 são cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC). Estes isolados foram mantidos em glicerol 20%. Para reativação, as bactérias foram transferidas para tubos contendo 3 ml de caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB), acrescido de 0,6% de extrato de levedura e incubados a temperatura 30° C por 24 h. Após seu crescimento, foram semeadas por esgotamento em placas *Trypticase Soy Agar* (TSA) com 0,6% de extrato de levedura, e incubados a 30° C por 24 h.

2.2 Identificação das bactérias por MALDI-TOF/MS

A identificação dos isolados foi realizada através do método de *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectroscopy* (MALDI-TOF/MS). Esta técnica foi realizada através do método de extração química, de acordo com o protocolo etanol/ácido fórmico. Os isolados foram cultivados em meio *Trypticase Soy Agar* (TSA) com 0,6% de extrato de levedura a 30 °C por 24 h e aproximadamente 5-10 mg de material foram utilizados nesta análise. Este procedimento foi realizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS pelo equipamento MALDI Bioyper 4.0 software MBT OC.

2.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes pelo método da microplaca

A capacidade de formação de biofilme *in vitro* foi determinada de acordo com o descrito por (Stepanovic, 2004). As placas de microtitulação de poliestireno (96 poços) estéreis foram preenchidas com 180 µL de caldo TSB acrescido de 0,6% de extrato de levedura. As espécies de *Listeria* sp. foram ressuspensas em solução salina e ajustadas conforme escala 0.5 de McFarland, e 20 µl dessa solução foi inoculada por poço, sendo experimento realizado em octuplicata. Para o controle negativo, foi empregado somente TSB acrescido de extrato de levedura, seguido pelo controle positivo *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, bactéria já descrita como forte formadora de biofilme. As placas de microtitulação foram incubadas 35°C por 48 h (Borucki, 2003). O caldo TSB com crescimento bacteriano foi aspirado com micropipeta, e as amostras foram lavadas com 200 µL



solução salina estéril. A fixação das bactérias foi realizada com 200 µL de metanol p.a. durante 20 min, em seguida as microplacas foram mantidas invertidas, *overnight*. Após a microplaca foi corada com 200 µl de cristal violeta 0,1% durante 15 min, seguido de lavagem da placa com água destilada estéril. Após a secagem das placas, o botão corado fixado ao fundo dos poços foi ressuscitado em 200 µl de etanol (95%), e as microplacas foram mantidas em repouso durante 30 min e então realizada a quantificação dos biofilmes. A densidade óptica (D.O) dos biofilmes bacterianos foi quantificada com auxílio de um leitor espectrofotômetro de microplacas com comprimento de onda de 595 nm (Marca: Anthos 2010 Type 17 550 S. Nº 17 550 4894). A classificação para formação do biofilme seguiu os critérios descritos por (Christensen,1985) e Chusri, Phatthalung e Voravuthikunchai (2012). A D.O média do controle negativo foi o ponto de corte (PC). Os isolados foram classificados da seguinte forma: Não formadores de biofilme (NF): amostras cuja D.O será menor que o ponto de corte. Fracos formadores de biofilme (FRA): amostras com D.O média acima do ponto de corte, porém menor ou igual ao dobro do PC. Moderados formadores de biofilmes (MF): amostras com D.O média acima do dobro do PC, porém menor ou igual a 4 x o PC. Fortes formadores de biofilme (FF): amostras com D.O média maior do que 4 x o valor do PC.

2.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos, as espécies bacterianas foram submetidas ao teste de disco-difusão. As suspensões das 15 bactérias foram padronizadas pela escala de McFarland 0.5 e semeadas em superfície de Agar Muller-Hinton com 5% de sangue de cavalo desfibrinado. Foram empregados os discos de antibióticos contendo penicilina (1 UI); ampicilina (2 µg); meropenem (10 µg); eritromicina (15 µg) e sulfazotrim (25 µg), conforme recomendações da *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2019). Também foram empregados os discos de ciprofloxacina (5 µg); clindamicina (2 µg); tetraciclina (30 µg) conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute 26th Edition* (CLSI 2016). As placas foram incubadas a 35±1°C, 18±2h. Posteriormente todas as placas foram interpretadas conforme as recomendações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação das espécies de *Listeria* sp. a partir da técnica de MALDI-TOF/MS

Na tabela 1, listamos a identificação em nível de espécies das *Listeria* sp. isoladas a partir de amostras de produtos de origem animal, fatiados e de superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria na cidade de Porto Alegre-RS. Outras espécies isoladas de outros produtos foram também estudadas e identificadas.

Tabela 1. Espécies de *Listeria* sp. identificadas em MALDI-TOF/MS e respectivas origens

Espécies	Código	Origem
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 35152	American Type Culture Collection
	ATCC 7644	American Type Culture Collection
	17D78/03	Isolado de Alimentos
	4B	Isolado de Alimentos carcaça de frango
	4C	Isolado de Alimentos
<i>Listeria innocua</i>	QF Oxford	Isolado de queijo fatiado
	6B	Isolado de Alimentos
	L10	Isolada do leite cru de búfala
	L13	Isolada do leite cru de búfala
<i>Listeria seeligeri</i>	L07	Isolada do leite cru de búfala
	BP Palcam	Isolada da bancada do presunto
	MP Oxford	Isolada de mãos manipulador de alimento
	PF Oxford	Isolado de Presunto fatiado
	BP Oxford	Isolado de bancada de queijo
	BQ Oxford	Isolado de bancada de queijo

Deste grupo de bactérias identificadas, 4 são da espécie *L. monocytogenes*, 4 de *L. innocua* e 5 pertencentes a espécie *L. seeligeri*. Deste modo o trabalho corrobora com Skowron (2019) que analisou a contaminação de queijo e em 250 amostras observou 26 análises positivas e relatou *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* sendo 15,7,4 respectivamente. A *Listeria monocytogenes* tem sido a causa microbiana mais comum de recalls relacionados a queijos nos Estados Unidos e Canadá. Esta espécie é associada à contaminação cruzada envolvendo equipamento e ambiente (Sauders, 2016).

3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Quanto a capacidade de formar biofilme, até o presente momento, dos 15 isolados estudados obtivemos os resultados das análises em triplicatas de apenas 4 bactérias, conforme a Tabela 2. As demais encontram-se em estudo.

Tabela 2. Classificação do potencial de formação de biofilme por *Listeria* sp. isoladas em amostras de alimentos

Microrganismo (espécie)	Código	Origem	Classificação
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 35984	American Type Culture Collection	FF
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644	American Type Culture Collection	MF
<i>Listeria monocytogenes</i>	17D78/03	Isolado de Alimentos	MF
<i>Listeria innocua</i>	L13	Isolada do leite de búfala	MF
<i>Listeria seeligeri</i>	BP Oxford	Isolado de bancada de queijo	MF

NF- Não formador de biofilme; FRA- Fraco formador de biofilme; MF- Moderado formador de biofilme; FF- Forte formador de biofilme.

Diante disso, as bactérias analisadas demonstraram moderado potencial formador de biofilmes nas condições estudadas, conforme vem sendo relatado por Fagerlund (2020) sobre biofilmes de *Listeria monocytogenes* formados em locais de processamento de alimentos.

3.3 Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Na avaliação da susceptibilidade aos antibióticos observou-se que dos 15 isolados pesquisados 10 (66,6%) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico testado. Deste grupo resistente, os isolados *L. monocytogenes* 4C e *L. seeligeri* BP Oxford, apresentou este perfil a clindamicina (2 µg) e a sulfazotrim (25 µg). As bactérias *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. monocytogenes* 17D78/03, *L. innocua* L13 e *L. seeligeri* BQ Oxford apresentaram sensibilidade intermediária a clindamicina (2 µg), sendo que o isolados BQ Oxford apresentou este perfil também a ciprofloxacina (5 µg).

Tabela 3. Resultados da avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos de *Listeria* sp. testadas

Microrganismo	Código	Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos
		S I R
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 35152	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	ATCC 7644	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	17D78/03	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP
	4B	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	4C	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP
	QF Oxford	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT
<i>Listeria innocua</i>	6B	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	L10	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	L13	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP
	L07	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
<i>Listeria seeligeri</i>	BP Palcam	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT
	MP Oxford	ERI; AMP; CLI; TET; PEN; MER; CIP;SUT
	PF Oxford*	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP; SUT
	BP Oxford	ERI; AMP; TET; PEN; MER; CIP
	BQ Oxford	ERI; AMP; TET; PEN; MER; SUT

S-Sensível; I- Intermediário; R- Resistente; ERI- Eritromicina (15 µg); AMP- Ampicilina (2 µg); CLI- Clindamicina (2 µg); TET-Tetraciclina (30 µg); PEN- Penicilina (1 UI); MER- Meropenem (10 µg); CIP- Ciprofloxacina (5 µg); SUT- Sulfazotrim (25 µg); * crescimento a 30°C.

4. CONCLUSÕES

Este estudo identificou 3 espécies de bactérias isoladas de produtos de origem animal fatiados e superfícies de manipulação de alimentos em Laboratórios de Fiambreteria, bem como de outros alimentos. As espécies identificadas foram: *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. seeligeri*. Contudo a pesquisa demonstrou que, dos isolados de *Listeria* sp. até então analisados, as 4 espécies testadas apresentaram capacidade de formar

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

biofilmes *in vitro* a 35°C por 48 h. Os demais isolados encontram-se em estudo, necessitando finalizar as análises. A formação de biofilme por *Listeria* sp. foi independente da espécie. Embora todas as bactérias estudadas demonstraram sensibilidade a maioria dos antibióticos, 12 (80%) destas apresentaram perfil de resistência (R ou I) a pelo menos 1 antibiótico podendo representar potencial risco para consumidores.

As superfícies e os alimentos manipulados de forma inadequada podem abrigar estes microrganismos, e como potencial formadoras de biofilmes aumentam a prevalência de *Listeria* sp. nestes locais, tornando assim motivo de preocupação para o setor de alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Douglas RC. (2003). Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. *American Society for Microbiology*. 69(12), 7336-7342.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, and Beachey EH. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 22(6), 996-1006.
- Chusri S, Phatthalung PN, Voravuthikunchai SP. (2012). Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. 54(6), 511-7.
- Costanzo, N., Ceniti, C., Santoro, A., Clausi, M. T., & Casalinuovo, F. (2020). Foodborne Pathogen Assessment in Raw Milk Cheeses. *International journal of food Science*. 20(1), 1-5.
- Eucast- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Breakpoint Tables v. 9.0, valid from*. (2019). Disponível em: <http://www.eucast.org>.
- Fagerlund A, Heir E, Moretro T, Langsrud, S. (2020). *Listeria Monocytogenes* Biofilm Removal Using Different Commercial Cleaning Agents. *Molecules Basel, Switzerland*, 25(4), 777-792.
- Galié S, Gutiérrez CG, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*. 898(9), 1-18.
- Orsi RH, Wiedmann M. (2016). Características e distribuição de *Listeria* spp., Incluindo espécies de *Listeria* recém-descritas desde 2009. *Appl Microbiol Biotechnol*. 100(12), 5273-5287.
- Pasonen P, Ranta J, Tapanainen H, Valsta L, Tuominen P. (2019). *Listeria monocytogenes* risk assessment on cold smoked and salt-cured fishery products in Finland - A repeated exposure model. *International Journal of Food Microbiology*. 304(1), 97-105.
- Sauders BD, D'Amico DJ. (2016). *Listeria monocytogenes* cross-contamination of cheese: risk throughout the food supply chain. *Epidemiology and Infection*. 144(13), 2693-2697.
- Skowron K, Wiktorczyk N, Grudlewska K, Kwiecińska-Piróg J, Walecka-Zacharska E, Paluszak Z, Gospodarek-Komkowska E. (2019). Drug-susceptibility, biofilm-forming ability and biofilm survival on stainless steel of *Listeria* spp. strains isolated from cheese. *Food Microb*. 296(2), 75-82.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*. 38(5), 428-432.
- Zetzmann M, Bucur F I, Crauwels P, Borba D, Nicolau A I, Grigore-Gurgu L, Seibold G M, Riedel C. (2019). Characterization of the biofilm phenotype of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in *agr* peptide sensing. *MicrobiologyOpen*, 826(8), 1-9.

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



www.officeeventos.com.br