



FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR DE CEPAS DE *SALMONELLA* SPP. MULTIRRRESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

Salmonella, resistência a antimicrobianos, formação de biofilmes

Autoras:

Gabriella Neves- FEA-UNICAMP

Francisca Airlane Esteves de Brito- FEA-UNICAMP

Profª Dra. Maristela da Silva do Nascimento- FEA-UNICAMP

INTRODUÇÃO:

Pertencente à família Enterobacteriaceae, o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo essa a de maior evidência em correspondência ao número de suas subespécies (ANDREWS *et al.*, 2018). Essas bactérias são ubiqüitárias e conseguem sobreviver em condições desfavoráveis por meses (WHO, 2019). A *Salmonella* é um grande problema para a saúde pública no mundo, afetando animais e humanos (DOMÉNECH *et al.* 2016). No período correspondente de 2007 a 2020, no Brasil, foram relatados cerca 9.030 surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA), com 160.702 doentes e 146 óbitos. Desse total, apenas 36,27% (3.275) tiveram o agente etiológico identificado, e, ainda assim, *Salmonella* spp. foi a principal responsável pelos surtos (24,8%) (BRASIL, 2021).

Além da virulência e patogenicidade, outro importante fator relacionado a este microrganismo é a ampla taxa de resistência antimicrobiana (MDR), considerada prioridade para a Organização Mundial da Saúde (TACCONELLI *et al.*, 2018; WHO, 2019). O amplo uso de agentes microbianos, como forma de tratamento ou prevenção, tem contribuído para a resistência dos microrganismos (KUANG *et al.*, 2018).

Salmonella é capaz de formar biofilmes - comunidades biológicas complexas formadas por uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que podem aderir-se umas às outras ou a superfícies abióticas (ĆWIEK *et al.*, 2020; URUÉN *et al.*, 2021). Estas cepas podem estar presentes em toda cadeia produtiva de alimentos, trazendo novos desafios aos métodos de higienização comumente utilizados (GONZÁLEZ *et al.*, 2018). A maioria dos sanitizantes, quando utilizados nas concentrações recomendadas, é eficiente contra células planctônicas de *Salmonella*. No entanto, quando se trata de biofilmes, os efeitos destes compostos podem ser relativamente diminuídos (MØRETRO *et al.*, 2012). Sanitizantes como hipoclorito de sódio são os mais utilizados na indústria de alimentos e foram amplamente avaliados contra patógenos de origem alimentar (ANDRADE *et al.*, 2008). Todavia, poucos trabalhos relacionam o efeito destes sanitizantes em biofilmes formados por cepas de *Salmonella* MDR. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de formação de biofilmes por cepas de *Salmonella* MDR e sensíveis a antimicrobianos, bem como o efeito da sanitização por cloro nesses biofilmes.

METODOLOGIA:

ORIGEM DOS ISOLADOS

Os experimentos foram realizados utilizando-se 20 cepas de *Salmonella* MDR e 10 cepas sensíveis a antimicrobianos, isoladas entre os anos de 2005 e 2019 (NÓBREGA, 2016; BENEVIDES, 2019). As cepas foram armazenadas em biofreezer a -75 °C, em Caldo Trypticase de Soja (TSB) suplementado com 3,5% de glicerol (v/v), localizado no Laboratório de Higiene e Legislação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Para reativação das cepas, pérolas de vidro foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), incubados a 37 °C por 20 h. Após este período, as cepas foram estriadas em Ágar Trypticase de Soja (TSA) inclinado, incubados a 37 °C por 20 h e posteriormente armazenados sob refrigeração (4 °C) até o momento de uso.

Tabela 1 – Informações de sorotipo e fonte de isolamento referentes às cepas de *Salmonella* MDR utilizadas no estudo (NÓBREGA, 2016; BENEVIDES, 2019).

MDR						Sensíveis		
Cepas	Fonte	Sorotipo	Cepas	Fonte	Sorotipo	Cepas	Fonte	Sorotipo
B100	Ave	Heidelberg	B42	Ave	Typhimurium	MZ 2280	Bovino	Meleagridis
1122	Ave	Saint Paul	S407	Ave	Senftenberg	MZ 1449	Humano	Muenster
B47	Ave	Typhimurium	S1139	Humano	Typhimurium	MZ 2426	Vegetal	Oranienburg
709	Humano	Muenchen	S41	Ave	Saint Paul	MZ 2275	Bovino	Anatum
B110	Ave	Heidelberg	S1095	Ave	Mbandaka	MZ 2272	Bovino	Kentuchy
B51	Ave	Typhimurium	S89	Ave	Saint Paul	MZ1492	Humano	Bovismorbificans
B107	Ave	Heidelberg	MZ 1313	Humano	Scharzengrund	MZ 1439	Humano	Java
B54	Ave	Heidelberg	S1061	Humano	Typhimurium	MZ 1437	Humano	Miami
B108	Ave	Rugosa (<i>S. enterica</i> subsp <i>enterica</i>)	S104	Ave	Saint Paul	MZ 1432	Vieiras	Weltevreden
B41	Ave	Typhimurium	B46	Ave	Typhimurium	MZ 0728	Ovos	Enteritidis

PREPARO DE INÓCULO

As cepas mantidas sob refrigeração foram inoculadas em 5 mL de TSB a 37 °C por 20 h. Posteriormente, foram realizadas estrias de isolamento em superfície de placas de TSA e incubadas conforme descrito anteriormente. Após incubação, as colônias foram transferidas para 5 mL de solução salina 0,85% e homogeneizadas em vórtex. O inóculo foi padronizado utilizando a escala de 0,5 de McFarland, aproximadamente 10⁸ UFC/mL (Densimat, BioMérieux). A contagem de células na suspensão foi determinada por diluições decimais seriadas, seguida de plaqueamento em superfície em TSA, com incubação a 37 °C por 24 h.

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME

A análise da formação de biofilme foi realizada pelo método de cristal violeta, utilizando microplacas de polipropileno de fundo chato com 96 poços, conforme STEPANOVIĆ et al. (2003). Inicialmente, foram adicionados 20 µL do inóculo, contendo cada uma das cepas de *Salmonella* (10⁷ UFC/mL) em 180 µL de TSB em cada poço - foram utilizados 3 poços por cepa. Como controle negativo (branco) de cada teste, utilizaram-se poços não inoculados preparados nas mesmas

condições, por placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 e 48 h. Após a incubação, o conteúdo dos poços foi descartado. Cada poço foi lavado três vezes com 300 µL de tampão fosfato estéril (PBS - pH 7,4) para a remoção de células planctônicas. As placas foram coradas pela adição de 200 µL de cristal violeta (1%) por 30 min em cada poço. Posteriormente, foram realizadas lavagens com água destilada e foram adicionados 200 µL de etanol 95%. Por fim, as placas foram submetidas à leitura, no comprimento de onda de 570nm, em luminômetro (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech). Os testes foram realizados em três ensaios independentes. Os valores foram registrados em densidade óptica (OD) e os biofilmes classificados em fraco ($OD < 0,16$); moderado ($0,16 < OD < 0,59$) e forte $OD > 0,59$ (Cusumano et. al., 2019). O software MARS (Optima Data Analysis) foi utilizado para análise e comparação dos resultados das densidades ópticas (OD).

AValiação DA RESISTÊNCIA A SANITIZANTES

Para avaliação da capacidade de resistência das cepas de *Salmonella* ao cloro, foi utilizado hipoclorito de sódio (200 mg/L) conforme metodologias de CRUZ E TAMMELA (2018) e PITTS et al. (2003). A formação dos biofilmes seguiu conforme descrito anteriormente. Após os períodos de incubação, o conteúdo dos poços foi removido. Cada poço foi lavado com 200 µL de solução tampão fosfato estéril (PBS - pH 7,4). Posteriormente, o sanitizante foi aplicado aos poços e permaneceu em contato com o biofilme por 0, 5, 10, 15 e 30 min. Após cada tempo de contato, os agentes foram removidos e os poços lavados duas vezes com 200 µL de solução neutralizante (tiosulfato de sódio 1%). Após remoção dos agentes neutralizantes, cada poço foi lavado 2 vezes com 100 µL de PBS. Posteriormente, foram adicionados mais 100 µL de solução PBS aos poços e as células do biofilme foram suspensas por pipetagem vigorosa. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas e determinação das contagens de *Salmonella* em TSA. O experimento foi realizado em três ensaios independentes.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de contagem de *Salmonella* foram submetidos ao teste de Tukey, para determinação de diferença entre as cepas avaliadas, com valores de probabilidade ($p < 0,05$), usando o software Estatística 10.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Das 30 cepas, apenas 23% (7) apresentaram fraca adesão para os dois tempos avaliados: S407(MDR), S41(MDR), S89(MDR), S1139(MDR), S1061(MDR), MZ2272(S) e MZ0728(S). Estas cepas foram isoladas de 4 fontes (ave, humano, bovino e ovos) e pertencem a 5 sorotipos diferentes. Não foi observada relação entre elas. No entanto, 73,7% (23) das cepas foram capazes de produzir biofilmes com moderada ou forte adesão após 24 h, e 60% (18) após 48 h.

A partir das densidades ópticas (OD) obtidas para cada cepa avaliada, construiu-se um gráfico comparativo para formação de biofilme, conforme Figura 1. Considerando os dados, é possível observar 18 cepas apresentando maior produção de biofilme nas primeiras 24 h (10 MDR's e 8 S), 8 cepas após 48 h (6 MDR's e 2 S) e 4 com produção similar nos dois períodos avaliados (3 MDR e 1 S). As cepas com maior produção de biofilme, considerando os dois períodos avaliados foram B51(MDR), S1122(MDR), B100(MDR), MZ 1449(S) e MZ 2275(S) – isolados de aves (3), humanos (1) e bovino (1).

Comparando os dois tempos, é possível observar que boa parte das cepas sensíveis apresentam maior produção de biofilme após 24 h, enquanto as cepas MDRs apresentam forte a moderada produção nos dois períodos, com produção mais acentuada em 48 h.

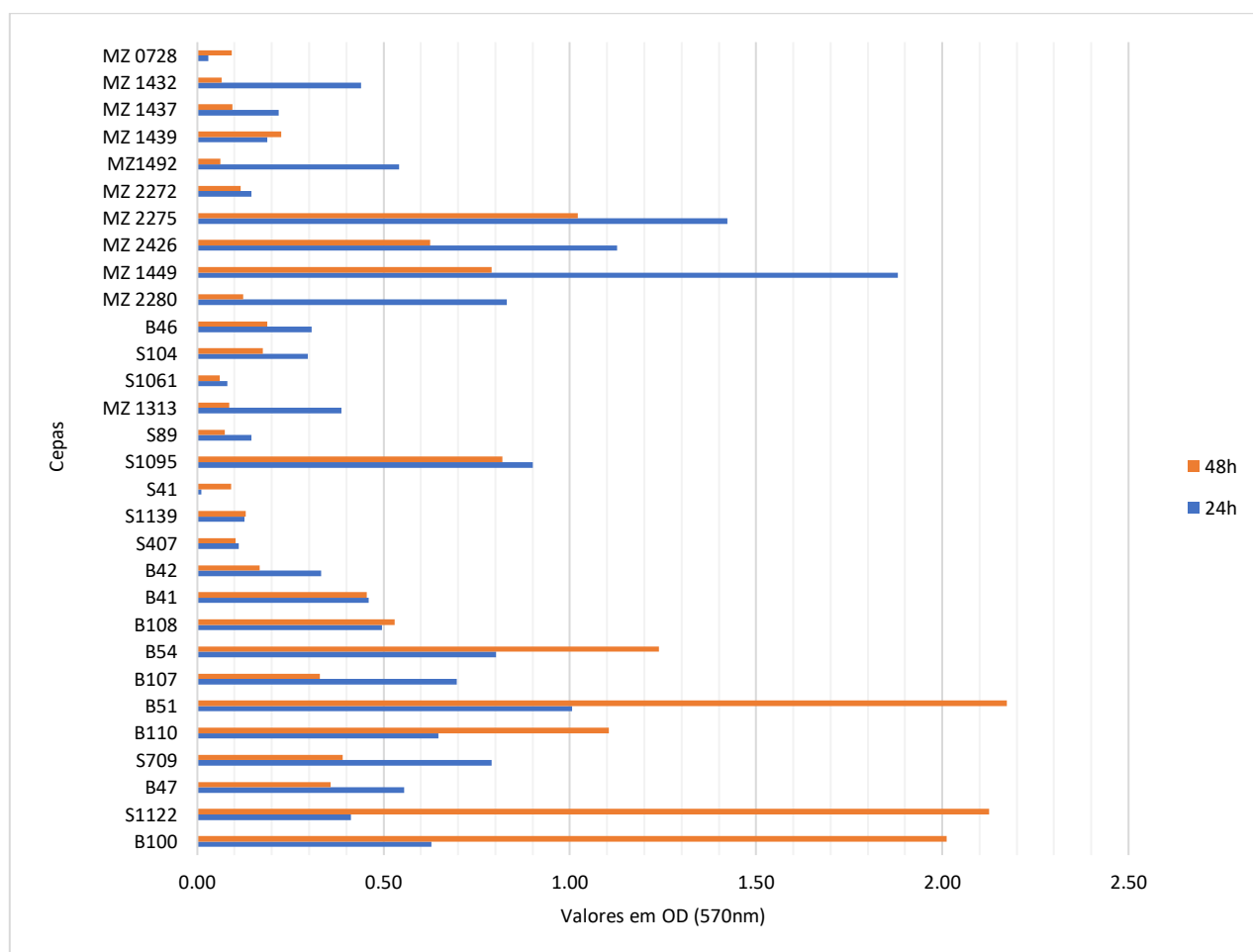


Figura 1 – Gráfico comparativo de formação de biofilme de cepas de *Salmonella* incubadas por 24 e 48 h.

De acordo com os dados obtidos, foram selecionadas 10 cepas (classificadas como forte ou moderadamente produtoras de biofilmes) para avaliação de resistência a sanitização por cloro.

Tabela 2 – Contagem de células de *Salmonella* spp. MDR (log UFC/mL) frente a sanitização com cloro.

Tempo (min)	Cepas ^A									
	S1095	MZ 1449	B51	B54	B108	MZ 2426	MZ 1437	MZ 1432	MZ 2275	B110
0	7.18 ^a	7.27 ^a	7.33 ^a	7.34 ^a	7.37 ^a	7.48 ^a	7.54 ^a	7.56 ^a	7.7 ^a	7.81 ^a
5	6.23 ^{abc}	6.40 ^{ab}	5.63 ^{bc}	5.6 ^{bc}	5.52 ^c	6.62 ^a	6.69 ^a	6.16 ^{abc}	6.12 ^{abc}	5.92 ^{bc}
10	4.33 ^c	4.84 ^{abc}	5.42 ^{abc}	5.42 ^{abc}	4.63 ^{abc}	5.54 ^{ab}	5.36 ^{bc}	4.47 ^{abc}	4.2 ^c	5.76 ^a
15	4.33 ^{abc}	4.26 ^{abc}	3.4 ^c	6.67 ^a	3.9 ^{abc}	4.53 ^a	4.96 ^a	4.23 ^{abc}	3.27 ^c	4.54 ^a
30	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a	<1.00 ^a

^AValores obtidos de três ensaios independentes

Como esperado, não houve diferença significativa entre as contagens no tempo inicial ($p > 0,05$). Após 5 min de exposição ao cloro, observou-se as primeiras reduções em aproximadamente 1 log UFC/ml. Após 15 min, observou-se reduções de 3 a 4 log UFC/ml. Todas as cepas alcançaram o limite de detecção (<1 log UFC/ml) após exposição de 30min ao sanitizante. As cepas consideradas mais resistentes foram B54 (MDR), MZ2426 (S) e B110 (MDR) e MZ1437 (S) - 3 fortemente produtoras de biofilme e 1 moderadamente, além disso, foram isoladas de 3 fontes diferentes (ave, vegetal e humano). Segundo MAHAMUNI et al. (2020), biofilmes funcionam como uma barreira composta por diversas camadas, capazes de impedir a chegada do agente a células, e podem ser de 10 a 1000

vezes mais resistentes aos compostos antimicrobianos. Nossos dados corroboram com o enunciado pelos autores, uma vez que as cepas consideradas com maior produção de biofilme foram também as mais resistentes ao cloro. No entanto, nenhuma relação foi observada entre resistência antimicrobiana e resistência ao cloro.

CONCLUSÕES:

Considerando os tempos avaliados para adesão e formação de biofilme, a maior parte das cepas apresentou maior produção de biofilme em 24 h. Além disso, as cepas com moderada a forte produção de biofilmes foram mais resistentes ao cloro, indicando a necessidade de protocolos de higienização mais acurados.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRADE, N.J.; PINTO, C.L.O.; ROSADO, M.S. Controle da higienização na indústria de alimentos. Higiene na indústria de alimentos - Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. 181-226. 2008
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual (BAM) on line**. FDA 2018. Chap. 5. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm> .
- BRASIL, SINAN/SVS/Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico 2021: Doenças tropicais negligenciadas**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/especiais/2021/boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf>.
- CRUZ, C. D., SHAH, S., & TAMMELA, P. (2018). Defining conditions for biofilm inhibition and eradication assays for Gram-positive clinical reference strains. *BMC microbiology*, 18(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1321-6>
- CUSUMANO, Jaclyn A. et al. Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 95, n. 4, p. 114877, 2019.
- ĆWIEK K, KORZEKWA K, TABIŚ A, BANIA J, BUGLA-PŁOSKOŃSKA G, WIELICZKO A. Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. **Pathogens**. 2020;9(8):643. Published 2020 Aug 7. doi:10.3390/pathogens9080643
- DOMÉNECH, E., JIMÉNEZ-BELENQUER, A., PÉREZ, R., FERRÚS, M.A., ESCRICHE, I. Risk characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat products. **Food Control**. v.57, p.18-23, 2015.
- KUANG, D., ZHANG, J., XU, X., SHI, W., CHEN, S., YANG, X., SU, X., SHI, X., MENG, J. Emerging High-level Ciprofloxacin Resistance and Molecular Basis of Resistance in *Salmonella enterica* from Humans, Food and Animals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 280, p. 1-9, 2018.
- MAHAMUNI, P. P., PATIL, P. M., BADIGER, M. V., PATEL, P. R., Thorat-Gadgil, B. S., Pandit, A., & Bohara, R. A. (2020). Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 108, 110319.
- Harrison, J. J., Ceri, H., & Turner, R. J. (2007). Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, 5(12), 928-938.
- MØRETRO, T., HEIR, E., NESSE, L.L., VESTBY, L.K., LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532 -544, 2012
- GONZÁLEZ, R. F; RIPOLLES, A. C; FONTECHA, U. F; RÍOS, C. A. G; RODRIGUEZ, J. J. J. Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 1261-1276, 2018.
- PITTS, B. et al. A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*, v. 54, n. 2, p. 269–276, 1 ago. 2003
- STEPANOVIĆ, Srdjan et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, v. 20, n. 3, p. 339-343, 2003
- TACCONELLI, E., CARRARA, E., SAVOLDI, A., HARBARTH S., MENDELSON, M., MONNET, D.L., PULCINI, C., KAHLMETER, G., KLUYTMANS, J., CARMELI, Y. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **Lancet Infectious Disease**, v.18, p.318-327, 2018. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- URUÉN C, CHOPO-ESCUIN G, TOMMASSEN J, MAINAR-JAIME RC, ARENAS J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. **Antibióticos (Basel)**. 2020; 10 (1): 3. Publicado em 23 de dezembro de 2020. Doi: 10.3390 / antibióticos10010003
- WHO – World Health Organization. **Salmonella (non-typhoidal)**. Disponível em [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Salmonella-(non-typhoidal)).