

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS ISOLADAS DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL

Vanessa Cortina Zanetti*¹; Jamile Caroline Siewerdt Duarte Silveira¹; Luisa Lobe¹; Álvaro Vargas Junior²; Sheila Mello da Silveira²; Silvani Verruck¹

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Florianópolis – SC. *E-mail: silvani.verruck@ufsc.br

²Instituto Federal Catarinense, Departamento de Engenharia de Alimentos, Concórdia – SC.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de bactérias potencialmente probióticas presentes em amostras de queijos coloniais artesanais frente a sete diferentes antibióticos. Bactérias isoladas de 8 amostras de queijos coloniais artesanais foram analisadas previamente quanto a coloração de Gram e teste de catalase, seguindo para identificação genotípica com o gene 16S rRNA. Em seguida foi realizado o teste de susceptibilidade a antimicrobianos a partir da concentração inibitória mínima (CMI) frente a ampicilina, benzilpenicilina, cefalexina, clindamicina, metronidazol, meropenem e estreptomycin. Os testes fenotípicos confirmaram as características das cepas isoladas como Gram-positivas e catalase negativa. A identificação genotípica identificou nos isolados duas espécies de *Lactocaseibacillus casei*, duas espécies de *Lactiplantibacillus plantarum*, uma espécie de *Levilactobacillus brevis* e uma espécie de *Pediococcus acidilactici*. Todas as espécies foram 100% resistentes à benzilpenicilina, metronidazol e cefalexina. Enquanto que para outros antibióticos a sensibilidade foi dependente da espécie testada. Todas as espécies de BAL isoladas de queijo colonial artesanal possuem susceptibilidade a pelo menos dois antibióticos recomendados, sendo portanto, candidatas em potencial para o seguimento de estudos para comprovação do efeito funcional probiótico.

INTRODUÇÃO

O uso de antibióticos na produção animal como promotor de crescimento, medida profilática ou para tratamento é taxado como uma das maiores fontes de consumo indireto de antimicrobianos por humanos. Além da contaminação agroalimentar, o uso indiscriminado de antibióticos em casos clínicos também desempenha um papel preocupante (1), e o desenvolvimento de microrganismos resistentes apresenta-se como uma das três maiores ameaças à saúde humana (2). Diversos autores têm apontado que as bactérias do trato gastrointestinal (TGI), como as bactérias ácido lácticas (BAL), podem se portar como reservas de genes de resistência a antibióticos, muitos desses inclusive já encontrados em bactérias patogênicas (3).

As BAL são encontradas naturalmente no TGI (4) e em diversos alimentos, como por exemplo nos derivados lácteos. São responsáveis pelo desenvolvimento de características desejadas devido aos processos fermentativos que desempenham. Em queijos, as BAL são encontradas naturalmente na microbiota de leite cru (5) e receberam atenção por abranger diversas espécies consideradas probióticas. Com isso, a demanda do mercado, para produtos lácteos tradicionais que contenham os microrganismos viáveis, suplementos e alimentos funcionais aumentou (6).

A definição mais recente de probióticos os define como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, fornecem um benefício à saúde do hospedeiro. O mecanismo de ação dos probióticos consiste, mas não se limita, no melhoramento da qualidade da microbiota intestinal pela exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, produção de metabólitos funcionais como aminoácidos, ácidos graxos de cadeia curta e enzimas (7).

Porém, por mais que sejam encontrados indigenamente no leite cru, para que sejam comprovados como microrganismos probióticos, devem passar por diversos testes para avaliar a segurança na aplicação em alimentos e/ou como suplementação. Os requisitos para comprovação de segurança e benefícios à saúde dos probióticos são tratados na RDC nº 241, de 26 de julho de 2018 (8). Na legislação, exige-se a identificação inequívoca da linhagem utilizada em alimentos, através de testes genotípicos e fenotípicos. Além disso, a espécie deve ter um histórico de uso seguro, ausência de fatores de virulência e patogenicidade à saúde humana, não produzir metabólitos que representem risco à saúde humana, ausência de genes de resistência à antibióticos transferíveis e por fim, susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (8).

OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de bactérias potencialmente probióticas presentes em amostras de queijos coloniais artesanais frente a sete diferentes antibióticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Bactérias ácido-láticas foram isoladas de queijo Colonial artesanal através do cultivo em ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e analisadas com através de coloração de Gram e teste de catalase.

A identificação bacteriana foi realizada utilizando o sequenciamento das regiões V3/V4 do gene 16s rRNA, com os primers 806R e 341F, utilizando o equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina Inc., USA). O sequenciamento foi *paired-end* usando o kit V3 com 600 ciclos. O *pipeline* usado foi o Neotools, onde as sequencias com primers seguiram para identificação. As identificações taxonômicas foram realizadas com blastn v.2.6.0+ usando banco de dados proprietário. As bactérias identificadas e duas cepas padrões seguiram para teste de susceptibilidade.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados seguindo o método de microdiluição em caldo (ISO 22776-1) (10) a partir da concentração inibitória mínima (CIM), com os antibióticos ampicilina, benzilpenicilina, cefalexina, clindamicina, metronidazol, meropenem e estreptomomicina. Os pontos de corte para CIM foram considerados a partir de publicações recomendadas (11, 12, 13).

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os microrganismos pretendidos para uso como probiótico foram selecionados conforme os resultados dos testes fenotípicos (morfologia, coloração de Gram e teste de catalase). Seguindo as características consideradas típicas de bactérias ácido láticas, foram selecionadas cepas com coloração Gram-positiva e catalase negativa (14).

A identificação genotípica identificou nos isolados duas espécies de *Lacticaseibacillus casei* (anteriormente *Lactobacillus casei*), duas espécies de *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente *Lactobacillus plantarum*), uma espécie de *Levilactobacillus brevis* (anteriormente *Lactobacillus brevis*) e uma espécie de *Pediococcus acidilactici*. Em concordância com esses resultados, outros trabalhos de isolamento de BAL de queijos coloniais também apresentaram o gênero *Lactobacillus* com bastante frequência, e cepas de *L. casei* e *L. plantarum* fizeram parte das consideradas predominantes (15, 16). Em seguida, para atender os requisitos pontuados pela RDC n° 241, de 26 de julho de 2018 (8) os testes de suscetibilidade a antimicrobianos relevantes foram realizados e os resultados apresentados na Tabela 01.

Tabela 01: Resultados de resistência/sensibilidade de cepas potencialmente probiótica a partir da concentração inibitória mínima (CIM)*.

Cepas	Amp	BenPen	Estrep	Clind	Cefa	Metro	Mero
<i>L. casei</i> CFd21	R	R	S	S	R	R	S
<i>L. plantarum</i> CFd21	R	R	S	S	R	R	S
<i>L. brevis</i> CFd14	S	R	S	R	R	R	S
<i>L. casei</i> RGd21	R	R	S	S	R	R	R
<i>L. plantarum</i> RGd14	S	R	S	R	R	R	S
<i>P. acidilactici</i> RGd14	S	R	S	S	R	R	S
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	R	R	R	S	R	R	S
<i>L. casei</i> BGP 93	S	R	R	S	R	R	S

*Pontos de corte estabelecidos por EUCAST (11); EFSA (12) e Gad *et al.* (13).

Amp: Ampicilina; BenPen: Benzilpenicilina; Estrep: Estreptomicina; Clind: Clindamicina; Cefa: Cefalexina; Metro: Metronidazol; Mero: Meropenem.

Por mais que diversas espécies de BAL sejam Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS) (17) todas que são pretendidas para uso como probiótico devem passar pelos testes para evitar a disseminação de genes de resistência na cadeia de alimentos. Todas as

espécies foram 100% resistentes à benzilpenicilina, metronidazol e cefalexina. Enquanto que para outros antibióticos a sensibilidade foi dependente da espécie testada.

BAL possuem suscetibilidade variada frente ao grupo das penicilinas. No presente trabalho os testes foram feitos com ampicilina e benzilpenicilina. Assim, 50% das cepas foram resistentes ao primeiro, enquanto que 100% foram resistentes ao segundo. Na literatura resultados variados são descritos, como exemplo em (6) e (4) que apresentam perfis diferentes de comportamento frente à ampicilina. Quanto à benzilpenicilina, usualmente são consideradas suscetíveis, entretanto, Belletti *et al.* (18) reportaram ampla faixa de resistência de *L. plantarum* ao mesmo antimicrobiano. Charteris *et al.* (19) corroboram com os resultados encontrados quando apontam que o comportamento é variável entre as espécies e antimicrobianos.

Pediococcus acidilactici são considerados como mais resistentes aos aminoglicosídeos do que as demais bactérias ácido lácticas (20, 21). Resultados similares foram vistos experimentalmente, onde a cepa de *P. acidilactici* teve CIM mais elevado, determinado em 64 µg/ml, contudo, ainda assim considerado suscetível para estreptomomicina. Por outro lado, clindamicina é usualmente considerada como eficaz contra BAL, ainda assim, diferentes relações foram estabelecidas com diferentes cepas de BAL no presente trabalho. Cepas de *L. casei* foram mais suscetíveis a clindamicina do que *L. plantarum* (18, 22). Por fim, na literatura é bastante difundido que os comportamentos são bastantes variáveis de acordo com a espécie/cepa analisada. Argumentações como essas são respostas para atividades não esperadas frente à antimicrobianos e são as causas da necessidade de testagem de todas as bactérias pretendidas para uso como probiótico.

CONCLUSÃO

Todas as espécies de BAL isoladas de queijo colonial artesanal possuem susceptibilidade a pelo menos dois antibióticos recomendados, sendo portanto, candidatas em potencial para o seguimento de estudos para comprovação do efeito funcional probiótico.

REFERÊNCIAS

1. DAS, D. J. *et al.* Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. **Nutrition** v. 69. Janeiro, 2020.
2. WANG K., *et al.* Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. **Journal of Agriculture and Food Research**. Novembro, 2019.
3. GEVERS D. *et al.* Molecular characterization of *tet(M)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. **Appl Environ Microbiol**. Fevereiro, 2003.
4. ZHOU N., *et al.* Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Chinese yogurts. **Journal of Dairy Science** v. 95, n. 9. Maio, 2012.
5. BROADBENT, J. R. *et al.* Influence of adjunct use and cheese microenvironment on nonstarter bacteria in reduced-fat Cheddar-type cheese. **J. Dairy Sci.**, 86 (2003), p. 2773-2782.
6. GAD, G. F. M., ABDEL-HAMID, A. M.; FARAG, Z. S. H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 45, p. 25-33, 2014.
7. Hill, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** v. 11 p. 506–514. 2014.
8. BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Ministério da saúde, 2018.

9. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. **Guia nº 21/2021** – versão 2, de 05/05/2021.
10. ISO. International Organization for Standardization. **ISO 20776-1**: 2019: Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.
11. EUCAST. Antimicrobial susceptibility tests on groups of organisms or agents for which there are no EUCAST breakpoints. EUCAST, 2021.
12. EFSA. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. **EFSA Journal**, 2018.
13. GAD, G. F. M., ABDEL-HAMID, A. M.; FARAG, Z. S. H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 45, p. 25-33, 2014.
14. DOMINGOS-LOPES, M.F.P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology** v. 63 p. 178-190 (2017).
15. RESENDE, M.F.S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1567-1573, 2011.
16. DELAMARE, A. P. *et al.* Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Characteristics of Serrano, an Artisanal Brazilian Cheese. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1068- 1075, 2012.
17. ZARZECKA, U. *et al.* Starter cultures as a reservoir of antibiotic resistant microorganisms. **LWT - Food Science and Technology** v. 127 (2020)
18. BELLETTI, N. et al. Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses **J Food Prot** v. 72 p. 2162–2169 (2009).
19. CHARTERIS W.P. *et al.*, Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species, **J. Food Prot.** V. 61 (12) (1998) p. 1636–1643.
20. ROJO-BEZARES, B. *et al.* Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. **International Journal of Food Microbiology** v. 111 p. 234 – 240 (2006)
21. KLARE, I. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of Lactobacillus, Pediococcus and Lactococcus human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, (2007) v. 59(5), p. 900–912.
22. SALMINEN, M.K. *et al.* Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. **Clinical Infectious Diseases** v. 42 (5), p. 35–44 (2006).