



Listeria innocua isolada de peixes: resistência a antibióticos e sanitizantes

Andressa Nilce Cabral; Daiane de Lima Martins; Helen Cristine Leimann Winter; Edgar Nascimento; Sandra Mariotto;

Rozilaine Aparecida Pelegrine Gomes Faria; Marilu Lanzarin; Daniel Oster Ritter

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso Campus Cuiabá Bela Vista

Palavras-chave

Segurança dos alimentos;
Qualidade dos alimentos;
Microrganismos patogênicos

Keywords

Food safety;
Food quality;
Pathogenic microorganisms

Resumo: Essa pesquisa teve como objetivo verificar o perfil de resistência de isolados de *Listeria innocua* aos principais antibióticos e agentes sanitizantes utilizados no controle bacteriano. Foram analisados 35 isolados, obtidos de amostras de peixes dulcícolas híbridos das espécies *Pseudoplatystoma fasciatum* × *Leiarius marmoratus* (pintado amazônico), *Colossoma macropomum* × *Piaractus mesopotamicus* (tambacu) e *Colossoma macropomum* × *Piaractus brachypomus* (tambatinga), provenientes da aquacultura e comercializados em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. A confirmação ao nível de espécie dos isolados, foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em seguida, os isolados foram submetidos a testes de resistência antimicrobiana, utilizando a técnica de difusão em disco para avaliar a sensibilidade frente a 23 antibióticos, bem como a suscetibilidade aos agentes sanitizantes ácido peracético, hipoclorito de sódio, cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio, álcool 70% e peróxido de hidrogênio a 3%. Os resultados mostraram que todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos sete antibióticos, com destaque para os grupos das cefalosporinas e penicilinas, classificando os isolados de *L. innocua* como multirresistentes, característica que agrava o tratamento de infecções bacterianas. Além disso, foi constatada resistência total (100%) dos isolados aos agentes sanitizantes ácido peracético, etanol 70% e hipoclorito de sódio. Esses achados evidenciam a presença de cepas multirresistentes de *L. innocua* em peixes dulcícolas comercializados em Cuiabá-MT, reforçando a necessidade de estratégias mais eficazes no controle microbiológico de alimentos, visando garantir a segurança dos alimentos e a saúde pública.

Abstract: This paper aimed to verify the resistance profile of *Listeria innocua* isolates to the main antibiotics and sanitizing agents used in bacterial control. The analysis included 35 isolates obtained from samples of hybrid freshwater fish of the species *Pseudoplatystoma fasciatum* × *Leiarius marmoratus* (pintado amazônico), *Colossoma macropomum* × *Piaractus mesopotamicus* (tambacu) and *Colossoma macropomum* × *Piaractus brachypomus* (tambatinga), from aquaculture and sold in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil. Confirmation at the species level was carried out using the Polymerase Chain Reaction (PCR). The isolates were then subjected to antimicrobial resistance tests using the disc diffusion technique to determine their sensitivity to 23 antibiotics, as well as their susceptibility to the sanitizing agents peracetic acid, sodium hypochlorite, n-alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, 70% alcohol and 3% hydrogen peroxide. The results demonstrated that all the isolates were resistant to at least seven antibiotics, especially the cephalosporin and penicillin groups, classifying them as multidrug-resistant, a characteristic that aggravates the treatment of bacterial infections. Totally resistant (100%) isolates were also found to the sanitizing agents peracetic acid, 70% ethanol and sodium hypochlorite. These conclusions highlight the presence of multiresistant strains of *Listeria innocua* in commercialized freshwater fish, reinforcing the need for more effective strategies in the microbiological control of food, with the aim of guaranteeing food safety and public health.



Introdução

Listeria innocua é uma bactéria gram-positiva, móvel, anaeróbia facultativa e não formadora de esporos, amplamente distribuída na natureza. Sua presença em alimentos tem sido verificada em estudos realizados em diferentes regiões do mundo. Embora tradicionalmente considerada não patogênica, *L. innocua* pode representar um risco subestimado, evidenciando possíveis implicações para a saúde pública (FAVARO et al., 2014; MOURA et al., 2019).

Na aquicultura, a presença de *L. innocua* pode indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas, comprometendo a qualidade microbiológica dos produtos e afetando a segurança dos alimentos. Além disso, cepas de *L. innocua* possuem a capacidade de formar biofilmes em superfícies, o que representa desafios significativos para a higienização em ambientes de processamento de alimentos (JORGENSEN et al., 2021; MAKUMBE et al., 2021).

Como medida preventiva e de controle da presença de bactérias nos tanques de cultivo de peixes, são utilizados agentes antimicrobianos; entretanto, seu uso indiscriminado, associado à presença de resíduos, está relacionado ao surgimento de comunidades microbianas resistentes em sedimentos, águas e nos próprios organismos aquáticos (MANCUSO et al., 2021; URBAN-CHMIEL et al., 2022).

Aguiar e Silva (2023) consideram que peixes contaminados com bactérias resistentes a agentes antimicrobianos atuam como vetores para a disseminação da resistência, impactando diretamente as estratégias de controle nas indústrias de alimentos e representando um risco à saúde pública, especialmente em casos de contaminação cruzada (OLIVER et al., 2020; CHEN et al., 2021).

Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resistência de isolados de *Listeria innocua* provenientes de peixes dulcícolas híbridos comercializados em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil, frente a diferentes classes de antibióticos e agentes sanitizantes amplamente utilizados.

Material e métodos

Obtenção das culturas

Neste estudo, foram utilizadas culturas de *Listeria innocua* provenientes do Laboratório de Análise Microbiológica de Alimentos (LAMA) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (IFMT), Campus Cuiabá Bela Vista, cedido por Leite (2022). As culturas foram originalmente isoladas a partir de amostras de peixes dulcícolas, produzido em sistema de aquicultura, das espécies *Pseudoplatystoma fasciatum* × *Leiarius marmoratus* (pintado amazônico), *Colossoma macropomum* × *Piaractus mesopotamicus* (tambacu) e *Colossoma macropomum* × *Piaractus brachypomus* (tambatinga). As amostras foram adquiridas em diferentes pontos comerciais de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

Os isolados bacterianos foram inicialmente cultivados em ágar tripticase soja suplementado com extrato de levedura, mantidos em tubos de ensaio inclinados e armazenados sob refrigeração a 4°C. Para a manutenção das cepas, as culturas foram recultivadas diariamente conforme o método descrito por Silva et al. (2017).

Caracterização molecular dos isolados

Culturas recentes dos isolados foram suspensas em água estéril e fervidas por dez minutos em banho seco (termobloco) de acordo com os métodos descritos por Park et al. (2021) para extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) por lise térmica. A identificação molecular foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido de eletroforese e foram realizadas segundo Mullis et al. (1986) e Tao et al. (2017), respectivamente.

Teste de suscetibilidade a antibióticos e sanitizantes

As culturas confirmadas para *L. innocua* foram analisadas quanto à resistência a antibióticos e sanitizantes, utilizando a metodologia de difusão em disco descrita por Bauer et al. (1966). Inicialmente as culturas recentes foram suspensas em tubos de ensaio contendo solução salina a 0,85% até atingirem uma turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente, foram inoculadas em placas de ágar Mueller-Hinton e, após a absorção do inóculo, foram acrescentados os discos de antibióticos e sanitizantes.

Os critérios de resistência adotados foram os limites estabelecidos para o grupo *Enterobacteriaceae* pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020), uma vez que até o momento da pesquisa não existem limites oficiais específicos para *Listeria* spp.

Foram testados 23 antibióticos comerciais, incluindo: amicacina (AMI 30µg); amoxicilina com ácido clavulânico (AMC 20 e 10µg); ampicilina com sulbactam (APS 10 e 10µg); ácido nalidíxico (NAL 30µg); cefepime (CPM 30µg); cloranfenicol (CLO 30µg); ceftazidima (CAZ 30µg); ampilicilina (AMP 2µg); ceftriaxona (CRO 30µg); cefuroxima (CRX 30µg); oxacilina (OXA 1µg); cefotaxima (CTX 30µg); ciprofloxacina (CIP 5µg); doxiciclina (DOX 30µg); eritromicina (ERI 15µg); estreptomina (EST 10µg); levofloxacina (LEV 5µg); nitrofurantoína (NIT 300µg); penicilina G (PEN 10U); trimetoprim-sulfametoxazol (SUT 25µg); tetraciclina (TET 30µg); meropenem (MPM 10µg) e rifampicina (RIF 5µg).

Os testes de suscetibilidade aos sanitizantes foram conduzidos com soluções preparadas de ácido peracético (300 mg/L), hipoclorito de sódio (225 mg/L) e cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio (769 mg/L), diluídos em água destilada, conforme metodologia proposta por Naue et al. (2014), com adaptações. Além disso, foram avaliados álcool 70% e peróxido de hidrogênio a 3%, adquiridos prontos para uso. Discos de papel estéreis foram umedecidos com as soluções de sanitizantes durante dez minutos e depositados nas placas inoculadas.

Após a incubação das placas, a 35 °C por 24 horas, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição. Os níveis de sensibilidade ou resistência foram interpretados conforme os critérios do CLSI (2020) para antibióticos e de Kuaye (2017) para sanitizantes.

Análise estatística

Os dados de resistência e sensibilidade foram organizados em tabelas eletrônicas no Microsoft Excel® e analisados por meio de estatística descritiva. As variáveis foram expressas em porcentagem para caracterização do perfil de resistência e sensibilidade dos isolados.

Resultados e discussão

Todos os 35 isolados de *L. innocua* foram confirmados pela técnica molecular da Reação em Cadeia da Polimerase. Os resultados da sensibilidade a antibióticos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Percentuais obtidos no teste de sensibilidade aos antibióticos testados com a *Listeria innocua* isoladas de peixes, separados por classes.

Classe	Antibiótico (Dosagem)	Resistente (%)	Intermediário (%)	Sensível (%)
Antagonista do folato	Trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg)	-	-	100
Agente de combinação beta lactâmicos	Amoxicilina com ácido clavulânico (20 e 10 µg)	-	-	100
	Ampicilina com sulbactam (10 e 10 µg)	-	-	100
Aminoglicosídeos	Amicacina (30 µg)	11,42	11,42	77,14
	Estreptomicina (10 µg)	28,57	34,28	37,17
Ansamicinas	Rifampicina (5 µg)	2,85	11,42	85,71
Carbapenêmicos	Meropenem (10 µg)	2,85	8,57	88,57
Cefema	Cefepime (30 µg)	100	-	-
	Ceftazidima (30 µg)	100	-	-
	Ceftriaxona (30 µg)	100	-	-
	Cefuroxima (30 µg)	97,14	-	2,85
	Cefotaxima (30 µg)	100	-	-
Fenicol	Cloranfenicol (30 µg)	-	5,71	94,28
Macrolídeos	Eritromicina (15 µg)	2,85	17,14	82,00
Nitrofuranos	Nitrofurantoína (300 µg)	22,85	11,42	65,71
Penicilinas	Ampicilina (2 µg)	28,57	-	71,42
	Oxacilina (1 µg)	100	-	-
	Penicilina G (10 U)	82,85	-	17,14
Quinolonas	Ácido nalidíxico (30 µg)	100	-	-
	Ciprofloxacina (5 µg)	22,85	45,71	31,42
	Levofloxacina (5 µg)	2,85	40,00	57,14
Tetraciclinas	Doxiciclina (30 µg)	-	-	100
	Tetraciclina (30 µg)	-	-	100

- Dado numérico igual a zero

Os resultados obtidos indicam que todos os isolados de *Listeria innocua* apresentaram resistência a pelo menos sete dos antibióticos testados, caracterizando-os como multirresistentes, uma vez que apresentaram resistência a mais de duas classes de antibióticos, conforme descrito pela WOA (2021).

A classe das cefalosporinas atua impedindo a síntese da parede celular bacteriana, e nesse estudo foi a classe em que houve maior percentual de resistência, com todos os isolados mostrando resistência total a cefepime, ceftazidima e cefotaxima. Esse resultado indica uma limitação significativa o uso dessas cefalosporinas no tratamento de infecções causadas por *Listeria innocua* (URBAN-CHMIEL et al., 2022).

Observou-se nesse estudo que os isolados apresentaram resistência à ampicilina e oxacilina, resultados preocupantes quanto a saúde pública, visto que esses antibióticos são amplamente utilizados em tratamentos clínicos (WOA, 2021). Estes resultados indicam uma mudança no comportamento de *Listeria innocua* em comparação com os dados de Guimarães, Momesso e Pupo (2010), que relataram maior sensibilidade da espécie a esses agentes no momento da pesquisa. Essa mudança de padrão representa um alerta para os órgãos de saúde pública, destacando a necessidade de revisões constantes das práticas de controle e uso de antibióticos.

Além disso, a resistência observada em antibióticos de diferentes classes, como quinolonas, penicilinas e aminoglicosídeos, sugere a presença de mecanismos de resistência variados, indicando uma capacidade adaptativa da bactéria. A mutação genética das células bacterianas ou a aquisição de genes de resistência frequentemente ocorrem devido ao uso inadequado de antibióticos, como dosagens incorretas ou tratamentos incompletos (JORGENSEN et al., 2021).

Embora *Listeria innocua* não seja uma bactéria comumente associada a infecções alimentares, sua resistência a múltiplos antibióticos levanta preocupações sobre sua potencial contribuição para o aumento da resistência bacteriana em ambientes clínicos. Esse risco é particularmente relevante em casos de sepse, quando o uso de antibióticos se torna imprescindível (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; JORGENSEN et al., 2021).

É importante destacar os resultados observados com trimetoprim-sulfametoxazol e doxiciclina/tetraciclina, que apresentaram 100% de sensibilidade, e com os macrolídeos, como a eritromicina, que apresentou 82% de eficácia. Tais resultados são semelhantes aos de Makumbe, Tabit e Dlamini (2021) e esses antibióticos podem ser considerados opções terapêuticas viáveis em ambientes clínicos para o tratamento de infecções causadas por *Listeria innocua*.

Os resultados da sensibilidade a sanitizantes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Percentuais do teste de sensibilidade à sanitizantes utilizados na indústria alimentícia frente a *Listeria innocua* isoladas de peixes.

Sanitizantes	Resistente (%)	Sensível (%)
Etanol 70%	100	-
Ácido peracético 300 mg/L	100	-
Peróxido de hidrogênio 3%	2,85	97,14
Hipoclorito de sódio 225 mg/L	100	-
Cloreto de n-alquil demetil benzil amônio 769 mg/L	-	100

- Dado numérico igual a zero

No teste de sensibilidade com sanitizantes específicos para a indústria alimentícia, o fenótipo de resistência dos isolados de *L. innocua* foi de 100% para o ácido peracético, etanol, e ao hipoclorito de sódio. A resistência total observada a esses agentes pode ser atribuída à exposição contínua e inadequada, favorecendo a seleção de cepas resistentes. Bland e colaboradores (2022) ao analisarem a transferência de genes de resistência entre espécies de *Listeria* afirmam que a exposição excessiva a desinfetantes comerciais pode levar à aquisição de resistência por parte de *L. innocua*, com a participação de plasmídeos na propagação dos genes de resistência entre as espécies de *Listeria*.

Em contrapartida, a alta sensibilidade observada pela ação do peróxido de hidrogênio e do cloreto de n-alquil dimetil benzil amônio, sugere que esses sanitizantes podem ser mais eficazes no controle de *L. innocua*, conforme evidenciado em pesquisas recentes (PEREIRA, 2024; DENG; MARIMANI; PATEL, 2021).

A resistência observada a sanitizantes como etanol, ácido peracético e hipoclorito de sódio reforça a necessidade de reavaliação dos protocolos de desinfecção na indústria de alimentos. A alternância de sanitizantes pode ser uma estratégia eficaz para reduzir a pressão seletiva sobre os microrganismos, prevenindo o desenvolvimento de resistência. Estudos sugerem que a rotação de desinfetantes pode minimizar a seleção de cepas resistentes, mantendo a eficácia dos processos de desinfecção (; DENG; MARIMANI; PATEL, 2021).

Conclusão

Os resultados obtidos evidenciam padrões crescentes de resistência aos antibióticos e sanitizantes em *Listeria innocua*, como cefalosporinas, quinolonas, penicilinas, etanol 70%, ácido peracético e hipoclorito de sódio. Por outro lado, foi verificada alta sensibilidade a antagonistas do folato, tetraciclina, peróxido de hidrogênio e quaternários de amônio. Os resultados obtidos nessa pesquisa ressaltam a necessidade de revisar e diversificar as estratégias de controle e higienização em todas as etapas da cadeia de produção, industrialização e comercialização de peixes para preservar a qualidade dos alimentos e a saúde pública.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso (CAPES/IFMT) através do Edital N° 001/2020 - RTR-SG/RTR-CG/RTR GAB/RTR/IFMT.

Referências

- AGUIAR, R.; SILVA, D. Vetores para disseminação da resistência antimicrobiana em alimentos. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, p. 23-29, 2023.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1966.
- BLAND, R.; BROWN, S. R.; WAITE-CUSIC, J.; KOVACEVIC, J. Probing antimicrobial resistance and sanitizer tolerance themes and their implications for the food industry through the *Listeria monocytogenes* lens. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 21, p. 1777-1802, 2022.
- CHEN, B.; WANG, L.; XU, S.; ZHANG, W.; LI, X.; ZHANG, T. Transfer of antibiotic resistance genes in *Listeria innocua*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1203, 2021.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
- DENG, X.; MARIMARI, M.; PATEL, M. Tolerância de *Listeria monocytogenes* a sanitizantes: implicações para a segurança alimentar. **Food Control**, v. 123, p. 107-113, 2021.
- FAVARO, M.; SARMATI, L.; SANCESARIO, G.; FONTANA, C. First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept. **JMM Case Reports**, v. 1, p. e003103, 2014.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. D. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p. 667-679, 2010.
- JORGENSEN, J.; BLAND, R.; WAITE-CUSIC, J.; KOVACEVIC, J. Diversidade e resistência antimicrobiana de *Listeria* spp. e clones de *L. monocytogenes* de instalações de manuseio e processamento de produtos no Noroeste do Pacífico. **Food Control**, v. 123, p. 107665, 2021.
- KUAYE, A. Y. **Limpeza e sanitização na indústria de alimentos**. v. 4. Atheneu, 324 p., 2017.
- LEITE, J. N. **Ocorrência e resistência a antimicrobianos de *Listeria* spp. em peixes comercializados em Cuiabá-MT**. 2022. 53 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso, Cuiabá, 2022.
- MAKUMBE, H. H.; TABIT, F. T.; DLAMINI, B. C. Prevalence, molecular identification, antimicrobial resistance, and disinfectant susceptibility of *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat foods. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 8, p. 1-9, 2021.
- MANCUSO, G.; MIDIRI, A.; GERACE, E.; BIONDO, C. Bacterial antibiotic resistance: The most critical pathogens. **Pathogens**, v. 10, p. 1310, 2021.
- MOURA, A.; DISSON, O.; LAVINA, M.; THOUVENOT, P.; HUANG, L.; LECLERCQ, A.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; ESHWAR, A.; STEPHAN, R.; LECUIT, M. Whole genome-based population biology and epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 16185, 2019.

- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, R.; SAIKI, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 51, p. 263-273, 1986.
- NAUE, C. R.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. D. C.; SOUZA, E. B. D.; MARIANO, R. D. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira 'Red Globe' no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 853-861, 2014.
- OLIVER, S. P.; MERRILL, M. L.; VISSER, S. A.; SANDERS, J.; KAMINSKI, K.; BROWN, M.; AMIN, M. Assessing and mitigating antimicrobial resistance in agricultural ecosystems. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 10394-10415, 2020.
- PARK, S. M.; KIM, H. W.; CHOI, C.; RHEE, M. S. Pathogenicity and seasonal variation of *Aeromonas hydrophila* isolated from seafood and ready-to-eat sushi in South Korea. **Food Research International**. v. 147, p.110484, 2021.
- PEREIRA, R. de C. L. **Avaliação da produção de biofilme e resistência a antimicrobianos, sanitizantes e metais pesados em cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas no Brasil**. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 2024.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; DE ARRUDA SILVEIRA, N. F.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Blucher, 535 p., 2017.
- TAO, T.; CHEN, Q.; BIE, X.; LU, F.; LU, Z. Investigation on prevalence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in animal-derived foods by multiplex PCR assay targeting novel genes. **Food Control**, v. 73, p. 704-711, 2017.
- URBAN-CHMIEL, R.; MAREK, A.; STEPIEN-PYSNIAK, D.; WIECZOREK, K.; DEC, M.; NOWACZEK, A.; OSEK, J. Antibiotic Resistance in Bacteria — A Review. **Antibiotics**, v. 11, p. 1079, 2022.
- WOAH. World Organization for Animal Health. **List of antimicrobial agents of veterinary importance**. 2021. Disponível em: <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-OMSA-list-antimicrobials-june2021.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2022.