



## INFLUÊNCIA DO USO DE CONCENTRAÇÃO SUBINIBITÓRIAS NA RESISTÊNCIA A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS

Palavras-chave: antimicrobianos; sanitizantes; resistência bacteriana; *Staphylococcus*.

Aluna: Maria Eugênia Betim - IB/UNICAMP

Orientadora: Nathalia Cristina Cirone Silva - FEA/UNICAMP

Co-autora: Bruna Lourenço Crippa - FEA/UNICAMP

---

### 1. Introdução geral

Bactérias são organismos muito diversos em forma, tamanho e função e podem ser encontrados em uma grande variedade de ambientes, incluindo organismos vivos, como os seres humanos. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria do grupo dos cocos que faz parte da microbiota humana e pode ser encontrada naturalmente nas fossas nasais, na garganta, no intestino e na pele de seres humanos. Contudo, apesar dessa característica, pode causar doenças que variam de infecções na pele, como espinhas e furúnculos, até doenças infecciosas mais severas, como pneumonia, endocardite, meningite, entre outras (Oiniciuc et al. 2019). Este microorganismo é o responsável pela maior causa de infecções em humanos (Abreu et al. 2021) e vem sendo avaliado como o mais perigoso, uma vez que expressa vários mecanismos patogênicos (Fontana e Favaro, 2018).

Além da espécie supracitada, são frequentemente estudados cepas não-aureus do gênero *Staphylococcus*. São os chamados *Staphylococcus* de coagulase negativa (CNS) e têm esse nome devido a ausência da enzima coagulase (Pereira e Cunha 2013). Embora possuam menor taxa de virulência, os CNS são responsáveis pela maioria dos casos de mastite bovina (Frey et al. 2013), infecção nas glândulas mamárias com baixa chance de cura (Rainard et al. 2018), alterando a qualidade do leite e causando grande perda para a economia de indústrias alimentícias (Halasa et al. 2007). Desse modo, *Staphylococcus não-aureus*, assim como os *aureus*, são um enorme motivo de preocupação (Martinez-Meléndez et al. 2015).

Sendo assim, torna-se necessária a necessidade de encontrar sanitizantes que apresentem eficácia no combate bacteriano, sendo preciso determinar a concentração mínima inibitória do sanitizante, para que este tenha capacidade de reduzir a produção de biofilme (Abreu et al. 2021). Desse modo, para a realização deste estudo, foram selecionadas 10 cepas de *Staphylococcus não-aureus* que foram previamente isoladas de leite bovino, pertencentes à coleção do Laboratório de Microbiologia II da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp.

### 2. Atividades desenvolvidas no período de setembro de 2023 à julho de 2024

Até o presente momento, foram realizadas as atividades de análise da concentração inibitória mínima (CIM) das 10 cepas de *Staphylococcus não-aureus* (NAS) selecionadas para esse estudo, bem como a análise do antibiograma das mesmas cepas, exposição das cepas a concentrações subinibitórias do antibiótico estudado e dos sanitizantes.

### 3. Objetivos

Os objetivos deste estudo são:

1. Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) de cepas de *Staphylococcus não-aureus* frente à oxacilina e sanitizantes
2. Avaliar a resistência por difusão em disco dos isolados.

### 4. Metodologia

As 10 cepas selecionadas para serem analisadas nesse estudo, foram isoladas em um estudo anterior (não publicado) onde cento e trinta e cinco cepas de *Staphylococcus não-aureus* (NAS) foram previamente isoladas de leite bovino. As cepas foram testadas quanto à presença de genes formadores de biofilme e, com base nos resultados da análise genotípica, foram selecionadas para serem testadas nesse estudo.

Foram feitas microdiluições em Caldo Nutriente em placas de 96 poços para determinar a concentração inibitória mínima dos sanitizantes cloreto de benzalcônio, hipoclorito de sódio e ácido peracético. A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços, servindo para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de sanitizantes, de acordo com os métodos modificados de El-azizi, Farag e Khardori (2016) e Iniguez-Moreno et al. (2017). Todas as cepas foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Após isso, as culturas foram padronizadas utilizando a escala de McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

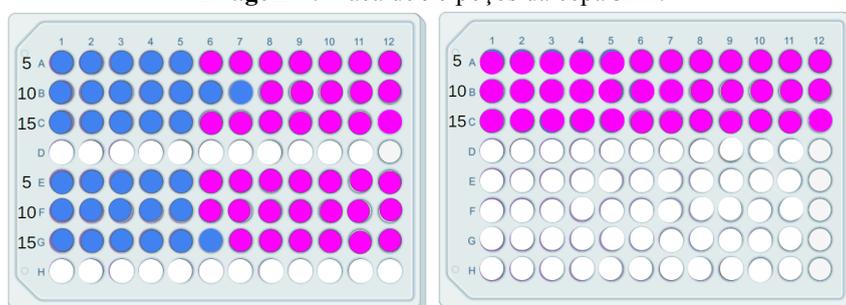
Em seguida, foram revestidas as placas com 90 mL de diluições seriadas de sanitizantes, começando com 1000 ppm. Serão testadas, ao todo, 12 concentrações de sanitizantes, sendo elas: 1000, 500, 250, 62,5, 21,25, 15,63, 7,81, 3,91, 1,95, 0,98 e 0,49 ppm. foi preparada uma solução estoque de 1000 ppm em água destilada estéril, sendo utilizada para as diluições até o valor de 0,49 ppm. Após as diluições, uma alíquota de 10 mL da suspensão bacteriana padronizada ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) foi inoculada resultando em uma carga bacteriana final de  $1 \times 10^7$  UFC/mL por poço e um volume final de 100 mL.

Depois da incubação a 20°C e diferentes tempos (5, 10 e 15 minutos), espera-se que os sanitizantes tenham sido desativados. A desativação foi realizada pela transferência de 10 mL de cada poço para a segunda placa de 96 poços, contendo 90 mL de Lethen, suplementado com 0,5% de Tween 80 para os sanitizantes.

Após esse processo, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Por fim, passadas as 24h, foi adicionado 50 mL de solução de resazurina a 0,01%. Os resultados foram percebidos visualmente: os poços com a menor concentração do agente antimicrobiano apresentaram uma cor azul, indicando a concentração inibitória mínima, e os poços que mudaram para cor rosa, indicam que as bactérias não foram inativadas. Todas as cepas foram analisadas em 3 repetições de microdiluições e coloração, a fim de confirmar os resultados de maneira mais precisa.

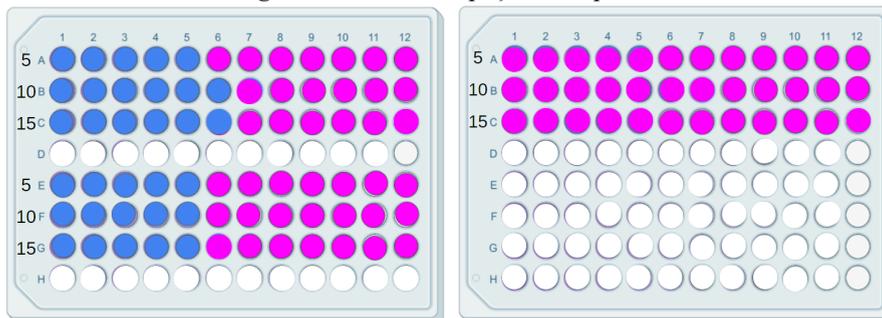
Abaixo, será apresentada uma ilustração (Imagem 1 e 2) das placas de 96 poços de duas cepas que apresentaram valores baixos de MIC, onde a coloração azul indica inibição do crescimento e a coloração rosa indica crescimento. As cepas escolhidas foram a 32A e a 212B, respectivamente, *S. epidermidis* e *S. chromogenes*.

**Imagem 1.** Placa de 96 poços da cepa 32A.



Legenda: As primeiras 3 linhas representam o sanitizante BAC, as segundas 3 linhas representam o hipoclorito de sódio e as últimas 3 representam o ácido peracético. Os números de 5, 10 e 15 representam os tempos, em minutos.

**Imagem 2.** Placa de 96 poços da cepa 212B.



Legenda: As primeiras 3 linhas representam o sanitizante BAC, as segundas 3 linhas representam o hipoclorito de sódio e as últimas 3 representam o ácido peracético. Os números de 5, 10 e 15 representam os tempos, em minutos.

Com a finalização da etapa anterior, foi realizada a análise do antibiograma de cada uma das cepas. Os antibiogramas foram feitos utilizando placas de ágar Müller-Hinton, onde nestas, foi necessário inocular as bactérias, também padronizadas utilizando a escala de McFarland 0,5 ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) e, além disso, foram colocados no mesmo disco, 10 antibióticos, a fim de visualizar a sensibilidade e resistência das cepas frente a estes antibióticos. Os antibióticos utilizados foram: gentamicina, oxacilina, cefoxitina, tetraciclina, eritromicina, tobramicina, penicilina, estreptomicina, clindamicina e cloranfenicol. Após esse processo, as placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24h e, passado o tempo de incubação, os halos formados pelos antibióticos foram medidos com a ajuda de um paquímetro. Abaixo, será apresentada uma tabela com os valores de referência ao tamanho do halo de ação de cada antibiótico, indicando se a cepa é resistente ou sensível ao este, de acordo com o tamanho do halo.

**Tabela 1.** Valores de referência ao tamanho dos halos de ação de cada antibiótico usado.

Antibióticos		R	I	S
gentamicina (10 µg)	GEN	≤ 12	13-14	≥ 15
oxacilina (1 µg)	OXA	≤ 17	-	≥ 18
cefoxitina (30 µg)	CEF	≤ 24	-	≥ 25
tetraciclina (30 µg)	TET	≤ 14	15-18	≥ 19
eritromicina (15 µg)	ERI	≤ 13	14-22	≥ 23
clindamicina (2 µg)	CLI	< 14	15-20	> 21
tobramicina (10 µg)	TOB	≤ 12	13-14	≥ 15
cloranfenicol (30 µg)	CLO	≤ 12	13-17	≥ 18
penicilina (10 µg)	PEN	≤ 28	-	≥ 29
estreptomicina (10 µg)	EST	≤ 11	12-14	≥ 15
<b>R</b>	Resistente			
<b>I</b>	Intermediário			
<b>S</b>	Sensível			

Em seguida, será realizada a última parte do projeto, onde serão analisados os efeitos de exposições subinibitórias no crescimento das cepas, frente aos sanitizantes e a oxacilina, onde a concentração destes será definida com base no resultado da primeira etapa. As placas serão preparadas e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  como descrito acima.

## 5. Resultados

Após a análise das 10 cepas de *Staphylococcus* não-aureus, foi possível observar os resultados da ação dos sanitizantes e da Oxacilina. Foi calculada a média dos resultados de cada um dos agentes antimicrobianos nas três repetições de cada cepa, bem como o desvio padrão e os valores obtidos foram para cada um foi: cloreto de benzalcônio apresentou uma média de ação de 105,25 ppm, com desvio padrão de 175,25; hipoclorito de sódio com média de 134,4 ppm e desvio padrão de 177,2; e o ácido peracético com média de 0,065 ppm e desvio padrão de 0,28. Os valores de desvio padrão diferem dos valores das médias, uma vez que os resultados possuem concentrações diferentes

de uma cepa para outra. Já a oxacilina apresentou uma média de 0,00183 ppm com desvio padrão de 0,0036 ppm.

Além disso, foi calculada também a média separada da ação dos sanitizantes (Tabela 2) e oxacilina (Tabela 3) para cada uma das cepas em cada um dos tempos observados (5, 10 e 15 minutos), como será apresentado abaixo.

**Tabela 2.** Média da ação dos sanitizantes, em ppm, das três repetições em cada uma das cepas nos três tempos analisados.

Sanitizante	Tempo	19A	32A	32B	126B	176B
BAC	5	125,0	83,3	416,7	125,2	83,3
	10	125,0	42,3	375,0	41,8	65,1
	15	145,8	62,5	375,0	62,7	41,7
Hp de sódio	5	83,5	83,3	83,7	104,3	125,0
	10	62,7	62,5	416,7	63,2	104,2
	15	31,4	41,7	416,7	125,2	104,2
Ac peracético	5	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	10	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	15	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0

Sanitizante	Tempo	181B	41B	66B	212B	250B
BAC	5	85,9	62,5	72,9	62,5	166,7
	10	104,2	52,1	31,3	52,1	62,5
	15	72,9	26,0	57,3	41,7	36,5
Hp de sódio	5	166,7	145,8	145,8	104,2	208,3
	10	93,8	83,3	229,2	104,2	104,2
	15	83,3	83,3	41,7	93,8	104,2
Ac peracético	5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	10	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Tabela 3.** Média da ação da oxacilina, em ppm, das três repetições em cada uma das cepas.

Cepas	Oxacilina (ppm)
19A	0,000105
32A	0,004641
32B	0,011285
126B	0,000105
178B	0,000105
181B	0,000352
41B	0,000105
66B	0,000105
212A	0,001301
250B	0,000141

Como é possível observar na tabela acima, a cepa 32B apresentou uma média maior, se comparada com as outras cepas analisadas. Isso se deve devido ao fato de ser uma cepa mais resistente, uma vez que apresenta o gene *qacAB* que é responsável pela resistência ao composto quaternário de amônio (QAC), sendo ele transportado por plasmídeos e codificados por bombas de efluxo (Abreu et al., 2021). Além de apresentar os genes responsáveis pela formação de biofilme: *ebps*, uma adesina responsável pela ligação às células hospedeiras através da sua ligação à elastina; o gene *cflA*, envolvido com adesão e evasão imunológica; e o gene *eno*, que codifica a  $\alpha$ -enolase e que é capaz de se ligar à laminina, atuando assim, como receptor de plasminogênio. Em suma, esses genes de biofilme são importantes na fase inicial do crescimento do biofilme (Zuniga et al., 2015).

Assim, será realizada um novo cálculo de média e desvio padrão dos sanitizantes sem levar em consideração os resultados obtidos em 32B. Os novos resultados foram: cloreto de benzalcônio obteve uma média de ação de 73,7 ppm e desvio padrão de 55,1 ppm; hipoclorito de sódio com média de 103,7 ppm e desvio de 76,7 ppm; e ácido peracético, com média de 0,07 ppm e desvio de 0,3 ppm.

Além disso, os resultados mostram que um dos sanitizantes, o ácido peracético, não possui uma concentração inibitória mínima suficiente para inibir o crescimento das cepas. O que pode ser explicado pela concentração inicial utilizada nesse estudo, que foi de 1000 ppm.

Com a finalização da análise do CIM das cepas, os antibiogramas foram realizados e mostraram os seguintes resultados, onde os valores representam o tamanho dos halos de ação de cada

antibiótico - células que apresentam dois valores indicam o valor do halo de fora e o de dentro, respectivamente, uma vez que alguns antibióticos apresentaram dois halos de ação.

**Tabela 4.** Antibiograma com os resultados das 10 cepas trabalhadas.

Código	Amostra	Espécie	Resistência a antibióticos									
			GEN	OXA	CEF	TET	ERI	CLI	TOB	CLO	PEN	EST
19A	FA0019a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
32a	FA0032a	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	I	R	R	S	R	R	R
32b	FA0032b	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R
212a	FA0212a	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
41B	FA0065d	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
66B	FA0078a	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
126B	FA0250b	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S
178B	FA0548	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
181B	FA0518	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
250B	FA1037	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

As células onde o resultado aparece com R, indicam uma forte resistência da cepa ao antibiótico testado, já os que estão com S, indicam a sensibilidade da cepa e os indicados com I, mostram cepas com halos de valor intermediário de ação.

## 6. Cronograma

Com base no cronograma previsto, foram realizadas as atividades de treinamento com técnicas de microbiologia bem como a realização das análises de concentração inibitória mínima (CIM) das 10 cepas de *Staphylococcus não-aureus* (NAS), o efeito da concentração subinibitória de antimicrobianos nas características de crescimento, susceptibilidade aos sanitizantes e oxacilina e susceptibilidade antimicrobiana além da realização do novo CIM e antibiograma das cepas obtidas na análise de concentração subinibitória.

## 7. Referências bibliográficas

- Abreu, A. C. da S. et al. (2021). Assessment of sanitiser efficacy against *Staphylococcus spp.* isolated from Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. International Dairy Journal. <<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105171>>.
- El-azizi, M., Farag, N., & Khardori, N. (2016). Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. <<https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.002>>.
- Fontana, C. e M. Favaro. (2018). Coagulase-Positive and Coagulase-Negative Staphylococci in Human Disease. Elsevier Inc., Amsterdam, the Netherlands. <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813547-1.00003-0>>.
- Frey, Y. et al. (2013). Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. J. Dairy Sci. <<https://doi.org/10.3168/jds.2012-6091>>.
- Gutiérrez, D. et al. (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. Appl. Environ. Microbiol. <<https://doi.org/10.1128/AEM.02045-12>>.
- Halasa, T., K. et al. (2007). Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: A review. <<https://doi.org/10.1080/01652176.2007.9695224>>.
- Iniguez-Moreno, M., Avila-Novoa, M. G., I ~ niguez-Moreno, E., Guerrero-Medina, P. J., ~ & Gutierrez-Lomeli, M. (2017). Antimicrobial activity of disinfectants commonly used in the food industry in Mexico. Journal of Global Antimicrobial Resistance. <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.013>>.
- Martínez-Meléndez, A. et al. (2015). Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) in coagulase negative staphylococci. Medicina Univsitaria. <<https://doi.org/10.1016/j.rmu.2015.10.003>>.
- Pereira, E. P. L. e Cunha, M. de L. R. de S. (2009). Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus spp.* resistente à oxacilina em alunos de enfermagem. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. <[doi:10.1590/s1676-24442009000500004](https://doi.org/10.1590/s1676-24442009000500004)>.
- Rainard, P. et al. (2018). Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. Transbound. <<https://doi.org/10.1111/tbed.12698>>.
- Zuniga E, Melville PA, Saidenberg ABS, Laes MA, Gonsales FF, Salaberry SRS, Gregori F, Brandão PE, dos Santos FGB, Lincopan NE and Benites NR (2015) Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus spp* isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. Microbial Pathogenesis 89, 1–6. <<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.08.014>>.