

# Resistência a antibióticos e presença de plasmídeos em enterobactérias e *staphylococcus aureus* isoladas do setor de dietética de um hospital público

## Resistance to antibiotics and presence of plasmid in enterobacteria and *staphylococcus aureus* in the sector of diet of a public hospital

Simone Cardoso Lisboa Pereira\*

Roberta Silva Ribeiro\*\*

Denise Mara Soares Bazzolli\*\*\*

Maria Cristina Dantas Vanetti\*\*\*\*

### Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar a presença de enterobactérias e *Staphylococcus aureus* em um setor de dietética de um hospital público brasileiro além de avaliar o perfil de resistência a antibióticos e a presença de DNA plasmidial nos isolados. A contagem e o isolamento de enterobactérias e de *S. aureus* foram realizados a partir de amostras coletadas de manipuladores de alimentos, utensílios e superfícies de processamento de alimentos. Procedeu-se à identificação bioquímica dos isolados e, quando necessária, a confirmação sorológica. A susceptibilidade a antibióticos de uso terapêutico foi determinada pela técnica de difusão em ágar e a detecção de plasmídeos foi realizada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. Foram identificados 14 gêneros e 27 espécies de enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas, num total de 127 isolados. Obteve-se 144 isolados de *S. aureus*, sendo que 143 apresentaram resultado positivo para a presença da enzima coagulase e da proteína A. Observou-se que 62% dos isolados Gram-negativos apresentaram resistência, a pelo menos, um dos antibióticos testados e em 74% desses, foi verificada a presença de DNA plasmidial. Dos isolados de *S. aureus*, 82,5% apresentaram resistência a antibióticos e, em 70,4 % foi identificado DNA plasmidial. Estes resultados denotam aspectos importantes como o risco de veiculação de bactérias resistentes a antibióticos, na sua maioria portadora de DNA plasmidial, por alimentos processados no ambiente hospitalar, podendo resultar em infecções e contribuir para o insucesso de terapias antimicrobianas.

**Palavras-chave:** Bactérias Gram-negativas. Enterobactérias. *Staphylococcus aureus*. Resistência a Antibióticos. Alimentação Hospitalar.

### Abstract

The occurrence of antibiotic-resistant bacteria has become more frequent and the presence of these microorganisms in hospitals exposes patients to serious risks. The presence of enterobacteria resistant to antibiotics and the presence of plasmid DNA in the isolates were evaluated in a sector of dietary action a Brazilian public hospital. The enumeration and isolation of enterobacteria were done in samples collected from food handlers, utensils, and food processing surfaces. Biochemical identification of the isolates was done, and serum confirmations as well when necessary. The susceptibility to antibiotics of therapeutic use was determined by the diffusion technique in agar and plasmidial DNA detection was done by agarose gel electrophoresis. Fourteen genera and 27 species of enterobacteria and others Gram negative bacteria were identified out of 150 isolates obtained. Seventy-four isolates (58%) presented resistance to antibiotics. Seventy-four percent of the antibiotic resistant isolates had plasmidial DNA. There was a significant difference between isolates resistant to ampicillin ( $p=0.00$ ) and kanamycin ( $p=0.03$ ) in relation to sources of the samples. The presence of plasmidial DNA was more prevalence in isolates resistant to antibiotics, but it was found that this correlation was significant only for the antibiotic tetracycline. These results show how important aspects of the risk of propagation of antibiotic resistant bacteria, the majority of plasmid DNA carrier, for processed foods in this environment and may result in hospital infections and contribute to the failure of antimicrobial therapies.

**Keywords:** Gram Negative Bacteria. Enterobacteria. *Staphylococcus aureus*. Resistance to Antibiotics. Hospital Diet.

DOI: 10.15343/0104-7809.20153902147156

\* Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Enfermagem, Departamento de Nutrição. E-mail: simoneclpereira@gmail.com.

\*\* Universidade Federal de Alfenas, Departamento de Nutrição, Alfenas – MG, Brasil. E-mail: betaribeiro@hotmail.com.

\*\*\* Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa – MG, Brasil. E-mail: dbazzolli@gmail.com.

\*\*\*\* Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Microbiologia, Viçosa – MG, Brasil. E-mail: cdvanetti@hotmail.com.

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## INTRODUÇÃO

A ocorrência de doenças causadas pela ingestão de alimentos se configura como um dos maiores problemas de saúde pública e é sempre foco de preocupação.<sup>1,2,3</sup> Apesar da dificuldade de se obter dados representativos destas enfermidades no Brasil, é consenso que a incidência dessas doenças requer a atenção pública, pois de 1999 até 2008 foram registrados 6.062 surtos de doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados.<sup>3</sup>

Os surtos de infecção ou intoxicação alimentar ocorrem não por falhas isoladas, mas por um conjunto de características peculiares à atividade de manipulação de alimentos. Entre os fatores que favorecem a ocorrência desses surtos, encontram-se manipuladores de alimentos, matéria-prima de má qualidade, contaminação cruzada, higienização inadequada de equipamentos, utensílios e superfícies de processamento.<sup>3,4</sup>

A veiculação de micro-organismos por alimentos preparados nos setores de dietética hospitalar tem um significado importante, pois são alimentos destinados muitas vezes, a pacientes vulneráveis. Neste contexto, a presença de bactérias resistentes à antibióticos representam maior risco à saúde, visto que podem ser fontes de genes de resistência para patógenos, pois o trato intestinal constitui um nicho apropriado para transferência de genes relacionados à resistência.<sup>5</sup> Com base nos resultados levantados na literatura, alguns autores sugerem que a transferência de plasmídeos, capazes de carrear mais de um gene de resistência associados, facilita a transmissão gênica horizontal de diferentes mecanismos de resistência entre as bactérias, agravando ainda mais o problema da resistência múltipla a antibióticos no ambiente hospitalar.<sup>6,7,8</sup>

Infecção hospitalar é um problema de grande relevância em saúde pública em todo mundo e, lamentavelmente, infecções adquiridas em hospitais ocorrem a uma taxa elevada. No Brasil essa realidade não é diferente, apesar de não se ter dados nacionais sistematizados sobre infecção hospitalar em serviços de saúde.<sup>9</sup>

Os alimentos parecem ser uma fonte efetiva para seres humanos adquirirem bactérias

resistentes a drogas, mas a extensão e as consequências reais desta exposição ainda não estão suficientemente investigadas.<sup>10,11</sup> Eventos de transferência horizontal de genes de resistência têm sido verificados entre bactérias patogênicas e bactérias da microbiota normal do hospedeiro e entre bactérias comensais derivadas de alimentos e as comensais humanas, porém são dados pouco conhecidos.<sup>5,11,12,13</sup> Essa transferência será provavelmente mais efetiva quando os hospedeiros forem, simultaneamente, submetidos a uma pressão seletiva por uma substância antimicrobiana para a qual os micro-organismos envolvidos são resistentes.<sup>14</sup> Deste ponto de vista, os hospitais são os ambientes onde micro-organismos resistentes a drogas e determinantes da sua resistência são mais prováveis de estarem presentes, portanto uma transferência gênica horizontal tem maiores chances de ocorrer e as consequências, em termos de falhas terapêuticas, podem ser mais graves.<sup>14,15,16,17</sup>

Diante do exposto, ressalta-se que um rigoroso e sistemático monitoramento dos riscos de origem alimentar deve ser adotado no ambiente hospitalar e, portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a contaminação por enterobactérias e *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos em fontes de contaminação de alimentos no setor de dietética de um hospital público e verificar nos isolados, a associação dessa resistência com a presença de plasmídeos.

## MÉTODOS

Foi avaliada a contaminação de mãos de manipuladores, utensílios e superfícies de processamento de alimentos de um serviço de alimentação hospitalar da Zona da Mata Mineira. As amostras coletadas de utensílios corresponderam a facas de corte e colheres de servir, enquanto que as de superfícies de processamento incluíram cubas de higienização de alimentos, tábua de altileno e vasilhames de alumínio. Essas amostras foram selecionadas com base no critério de relato de processo de higienização finalizado para uso próximo. Já a escolha dos manipuladores de alimentos foi aleatória, porém com a higienização das mãos também relatada como finalizada, para

manipulação imediata. Essas coletas ocorreram em seis momentos de visitas em semanas diferenciadas, no período de seis meses. A técnica utilizada para coleta das amostras foi a do *swab*.<sup>18</sup>

A determinação do número de enterobactérias nas amostras foi realizada pela contagem de colônias em ágar Bile Vermelho-Violeta (VRB), suplementado com 1% de glicose (VRBG).<sup>19</sup> Para identificação destes isolados foram realizadas análises de morfologia e coloração de Gram e utilizou-se o sistema de identificação de bactérias Gram-negativas Bac-tray (Difco Laboratories, Detroit, MI). Os isolados que apresentaram resultado característico para enteropatógenos nos testes bioquímicos, como *Salmonella* sp.; *Shigella* sp. e *Yersinia* sp., foram avaliados por teste sorológico, com antissoro polivalente para cada espécie (antígeno O, Difco). A confirmação das colônias suspeitas de serem *Salmonella* também foi feita em imunoanalisador MiniVidas (Biolab BioMerieux).<sup>19</sup>

A contagem de colônias típicas de *S. aureus* foi realizada em meio Baird-Parker, enriquecido com solução de gema de ovo e telurito de potássio.<sup>19</sup> As placas foram inoculadas com volumes de 0,3; 0,3 e 0,4 mL das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  das amostras coletadas. De cada amostra foram selecionadas três a cinco colônias características de *S. aureus* que foram reestriadas em ágar tripticaseína e soja (TSA) e mantidas em meio BHI semissólido a 4 °C.<sup>19</sup> Colônias suspeitas de serem de *S. aureus*, em ágar Baird-Parker, foram analisadas quanto à coloração de Gram, morfologia e arranjo celular e pelo teste Staph Latex (Difco Laboratories, Detroit, MI). Esse teste é baseado na aglutinação simultânea de coagulase e um antígeno de superfície, a proteína A, com partículas de látex amarelas sensibilizadas com antígeno específico, a proteína de plasma.

A susceptibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos foi determinada pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton, de acordo com o guia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)<sup>20</sup>. Os antibióticos utilizados para avaliar os isolados de enterobactérias e outras Gram-negativas foram: ácido nalidixico (30 µg), ampicilina (10 µg), canamicina (30 µg),

cloranfenicol (30 µg) e tetraciclina (30 µg); e para os isolados de *S. aureus* foram: cloranfenicol (30 µg) eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), penicilina G (10 un) e tetraciclina (30 µg). Após incubação a 37 °C por 48 h, os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com o Manual Difco (Difco Laboratories, Detroit MI). Os isolados foram reportados como resistentes se as medidas foram iguais ou menores que 11 mm para ampicilina, 12 mm para cloranfenicol, 13 mm para canamicina e ácido nalidixico e 14 mm para tetraciclina, 12 mm para gentamicina e cloranfenicol, 13 mm para eritromicina, e 28 mm para penicilina G.

A presença de DNA plasmidial foi determinada em todos os isolados de enterobactérias e outras Gram-negativas e *S. aureus*, em conformidade com o protocolo descrito por Maniatis e colaboradores.<sup>21</sup> Os produtos desta extração seletiva de DNA plasmidial foram analisados após eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%. Para identificar o DNA plasmidial dos isolados foram utilizados plasmídeos como padrões de massa molecular: PBTG, PVC18, PAT153 e PAN7.1.

### Análise dos dados

Os resultados da contagem de enterobactérias em Agar VRBG e *S. aureus* foram comparados com as recomendações e especificações estabelecidas pela *American Public Health Association* – APHA.<sup>19</sup> Para a análise dos dados relativos às enterobactérias foram adotados os valores relativos ao grupo de bactérias mesófilas aeróbias.

Os recursos estatísticos do programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 19.0 foram aplicados para verificar a existência de associação entre a presença de DNA plasmidial com resistência a antibióticos, fontes e gêneros de bactérias Gram-negativas, e fontes de isolamento de *S. aureus* pelo teste qui-quadrado de Pearson ao nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Os resultados revelaram uma expressiva variação na contaminação de manipuladores, utensílios e superfície de processamento de

alimentos, por enterobactérias e outras Gram-negativas e *S. aureus*. No entanto, verificou-se

maior contagem de *S. aureus* em amostras de mãos de manipuladores de alimentos (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prevalência de enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas e de *Staphylococcus aureus* em mãos de manipuladores, utensílios e superfícies de processamento de alimentos no setor de dietética de um hospital público. Minas Gerais, 2009.

| Amostras       |           | N° Amostras (%)      |                      |                      |                     |                                   |                      |                                   |                     |
|----------------|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Tipo           | N°        | UFC                  |                      |                      |                     |                                   |                      |                                   |                     |
|                |           | <10                  |                      | 10-10 <sup>2</sup>   |                     | >10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup> |                      | >10 <sup>4</sup> -10 <sup>5</sup> |                     |
|                |           | Gram (-)             | <i>S aureus</i>      | Gram (-)             | <i>S aureus</i>     | Gram (-)                          | <i>S aureus</i>      | Gram (-)                          | <i>S aureus</i>     |
| Manipuladores* | 18        | 11<br>(61,0%)        | 3<br>(16,7%)         | 0<br>(00,0%)         | 0<br>(00,0%)        | 7<br>(39,0%)                      | 6<br>(33,3%)         | 0<br>(00,0%)                      | 9<br>(50,0%)        |
| Utensílio**    | 16        | 7<br>(43,7%)         | 8<br>(50,0%)         | 4<br>(25,0%)         | 0<br>(00,0%)        | 5<br>(31,3%)                      | 8<br>(50,0%)         | 0<br>(00,0%)                      | 0<br>(00,0%)        |
| Superfície **  | 34        | 3<br>(08,8%)         | 21<br>(61,7%)        | 11<br>(32,4%)        | 0<br>(00,0%)        | 13<br>(38,2%)                     | 13<br>(38,2%)        | 7<br>(20,6%)                      | 0<br>(00,0%)        |
| <b>Total</b>   | <b>68</b> | <b>21</b><br>(30,9%) | <b>32</b><br>(47,0%) | <b>15</b><br>(22,1%) | <b>0</b><br>(00,0%) | <b>25</b><br>(36,7%)              | <b>27</b><br>(39,7%) | <b>7</b><br>(10,3%)               | <b>9</b><br>(13,3%) |

\*UFC/mão e \*\*UFC/cm<sup>2</sup>

Os resultados obtidos, pelo sistema de identificação bioquímico, revelaram a presença de 14 gêneros e 27 espécies de bactérias Gram-negativas entre os 127 isolados (Tabela 2). A maioria, cerca de 85%, pertence à família Enterobacteriaceae e dentre eles, foram identificados patógenos de origem alimentar como *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*. Os demais gêneros de enterobactérias identificados normalmente não estão associados com doenças entéricas e muitas espécies são referidas como patógenos oportunistas, no contexto hospitalar. Além de bactérias da família Enterobacteriaceae, foi possível identificar representante dos gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas* que foram mantidas no estudo para a avaliação de resistência antibióticos e presença de plasmídeos. Destaca-se, entre as bactérias Gram-negativas, maior número de isolados provenientes de superfícies de processamento de alimentos e maior frequência do gênero *Klebsiella*, em todas as fontes avaliadas (Tabela 2).

Ademais, obteve-se 144 isolados com colônias típicas de *S. aureus* em ágar Baird-Parker, com identificação confirmada pelos testes complementares, sendo que 143 apresentaram

resultado positivo para a presença da enzima coagulase e proteína A. Portanto, este resultado confirma a identificação de 98,6% dos isolados positivos, como sendo *S. aureus* coagulase positivo. Destes isolados, 63 (43,7%) foram provenientes de amostras de mãos de manipuladores de alimentos, 45 (31,2%) de superfícies de processamento e 36 (25 %) de utensílios.

Um número de 74 isolados Gram-negativos, que correspondeu a 52,1% do total isolado, apresentou resistência a agentes antimicrobianos. Destes isolados resistentes, a maior frequência foi resistência à tetraciclina não sendo verificada resistência ao ácido nalidixico (Tabela 3).

A avaliação da susceptibilidade a antibióticos dos 143 isolados de *S. aureus* demonstrou que, 118 (82,52%) apresentaram resistência. Maior prevalência de resistência em *S. aureus* foi verificada ao antibiótico penicilina G e todos estes foram sensíveis a cloranfenicol (Tabela 3). A detecção da presença de DNA plasmidial nos isolados de bactérias Gram-negativas resultou em diferentes padrões no gel de agarose (Figura 1).

**Tabela 2.** Bactérias Gram-negativas contaminantes de mãos de manipuladores, utensílios e superfícies de processamento de alimentos no setor de dietética de um hospital público em Minas Gerais, 2009.

| Gêneros              | Nº (%) de isolados identificados em: |                   |                              |                     |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------|
|                      | Manipuladores de alimentos           | Utensílios        | Superfícies de processamento | Total               |
| <i>Acinetobacter</i> | 4 (14,3%)                            | 5 (21,7%)         | 9 (11,8%)                    | <b>18 (14,2%)</b>   |
| <i>Cedecea</i>       | 0 (0,0%)                             | 2 (8,7%)          | 0 (0,0%)                     | <b>2 (1,6%)</b>     |
| <i>Citrobacter</i>   | 0 (0,0%)                             | 0 (0,0%)          | 1 (1,3%)                     | <b>1 (0,8%)</b>     |
| <i>Enterobacter</i>  | 1 (3,6%)                             | 0 (0,0%)          | 10 (13,2%)                   | <b>11 (8,7%)</b>    |
| <i>Escherichia</i>   | 0 (0,0%)                             | 4 (17,5%)         | 5 (6,6%)                     | <b>9 (7,1%)</b>     |
| <i>Hafnia</i>        | 0 (0,0%)                             | 3 (13,0%)         | 5 (6,6%)                     | <b>8 (6,3%)</b>     |
| <i>Klebsiella</i>    | 14 (50,0%)                           | 6 (26,2%)         | 25 (32,9%)                   | <b>45 (35,4%)</b>   |
| <i>Proteus</i>       | 0 (0,0%)                             | 0 (0,0%)          | 1 (1,3%)                     | <b>1 (0,8%)</b>     |
| <i>Pseudomonas</i>   | 4 (14,3%)                            | 1 (4,3%)          | 2 (2,6%)                     | <b>7 (5,5%)</b>     |
| <i>Salmonella</i>    | 0 (0,0%)                             | 0 (0,0%)          | 2 (2,6%)                     | <b>2 (1,6%)</b>     |
| <i>Serratia</i>      | 4 (14,3%)                            | 0 (0,0%)          | 7 (9,2%)                     | <b>11 (8,7%)</b>    |
| <i>Shigella</i>      | 0 (0,0%)                             | 1 (4,3%)          | 3 (4,0%)                     | <b>4 (3,1%)</b>     |
| <i>Tatumella</i>     | 1 (3,6%)                             | 0 (0,0%)          | 1 (1,3%)                     | <b>2 (1,6%)</b>     |
| <i>Yersinia</i>      | 0 (0,0%)                             | 1 (4,3%)          | 5 (6,6%)                     | <b>6 (4,7%)</b>     |
| <b>Total</b>         | <b>28 (22,0%)</b>                    | <b>23 (18,0%)</b> | <b>76 (60,0%)</b>            | <b>127 (100,0%)</b> |

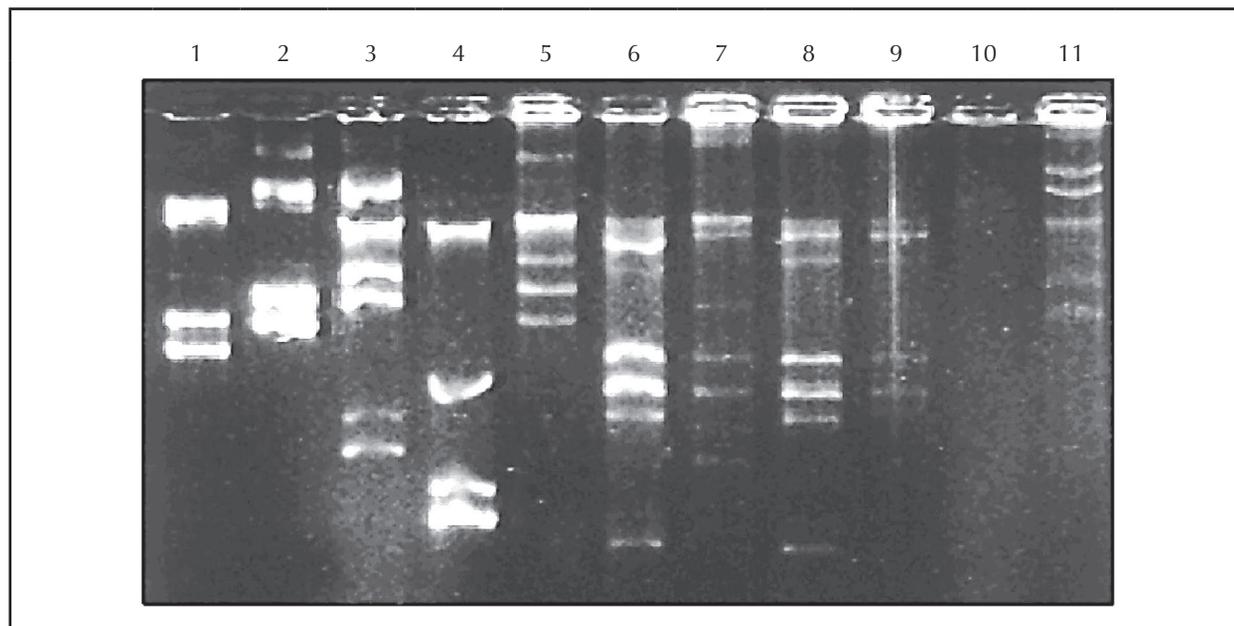
**Tabela 3.** Isolados de bactérias Gram-negativas e *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos e presença de DNA plasmidial. Minas Gerais, 2009.

| Gêneros Bactérias Gram negativas | Nº (%) de resistência a: |                   |                   |                  |                   | DNA Plasmidial    |
|----------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                                  | Ácido Nalidíxico         | Ampicilina        | Canamicina        | Cloranfenicol    | Tetraciclina      |                   |
| <i>Acinetobacter</i>             | 0 (0,0%)                 | 1 (6,0%)          | 3 (17,0%)         | 1 (5,5%)         | 1 (5,5%)          | 8 (44,4%)         |
| <i>Cedecea</i>                   | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 1 (100,0%)        | 1 (100,0%)        |
| <i>Citrobacter</i>               | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 1 (100,0%)        | 1 (100,0%)        |
| <i>Enterobacter</i>              | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 3 (2,7%)          | 0 (0,0%)         | 1 (0,9%)          | 5 (45,4%)         |
| <i>Escherichia</i>               | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 1 (11,1%)         | 0 (0,0%)         | 6 (6,7%)          | 7 (77,8%)         |
| <i>Hafnia</i>                    | 0 (0,0%)                 | 1 (12,0%)         | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 3 (37,5%)         | 4 (50,0%)         |
| <i>Klebsiella</i>                | 0 (0,0%)                 | 9 (19,0%)         | 6 (13,3%)         | 0 (0,0%)         | 7 (15,5%)         | 27 (60,0%)        |
| <i>Proteus</i>                   | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 1 (100,0%)        | 1 (100,0%)        |
| <i>Pseudomonas</i>               | 0 (0,0%)                 | 5 (71,4%)         | 1 (14,3%)         | 0 (0,0%)         | 5 (71,4%)         | 2 (28,6%)         |
| <i>Salmonella</i>                | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 1 (50,0%)        | 1 (50,0%)         | 2 (100,0%)        |
| <i>Serratia</i>                  | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 3 (27,0%)         | 0 (0,0%)         | 5 (45,0%)         | 7 (63,7%)         |
| <i>Shigella</i>                  | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 1 (25,0%)         | 1 (35,0%)         |
| <i>Tatumella</i>                 | 0 (0,0%)                 | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 2 (100,0%)        | 2 (100,0%)        |
| <i>Yersinia</i>                  | 0 (0,0%)                 | 1 (17,0%)         | 0 (0,0%)          | 0 (0,0%)         | 3 (50,0%)         | 3 (100,0%)        |
| <b>Total</b>                     | <b>0 (0,0%)</b>          | <b>17 (13,4%)</b> | <b>17 (13,4%)</b> | <b>2 (1,60%)</b> | <b>38 (29,9%)</b> | <b>68 (53,5%)</b> |

| Amostras             | Nº (%)             | Nº (%) de <i>S. aureus</i> resistentes a: |                  |                 |                   |                   | DNA Plasmidial     |
|----------------------|--------------------|---|------------------|-----------------|-------------------|-------------------|--------------------|
|                      |                    | Cloranfenicol                             | Eritromicina     | Gentamicina     | Penicilina G      | Tetraciclina      |                    |
| <i>Manipuladores</i> | 63 (43,8%)         | 0 (0,0%)                                  | 9 (14,0%)        | 2(3,2%)         | 25 (39,7%)        | 15 (23,8%)        | 33 (52,4%)         |
| <i>Utensílios</i>    | 36 (25,0%)         | 0 (0,0%)                                  | 1 (3,0%)         | 0 (0,0%)        | 29 (80,6%)        | 0 (0,0%)          | 30 (83,3%)         |
| <i>Superfície</i>    | 45 (31,2%)         | 0 (0,0%)                                  | 1 (2,0%)         | 0 (0,0%)        | 32 (74,4%)        | 4 (9,3%)          | 37 (86,0%)         |
| <b>Total</b>         | <b>144(100,0%)</b> | <b>0 (0,0%)</b>                           | <b>11 (8,0%)</b> | <b>2 (1,4%)</b> | <b>86 (60,6%)</b> | <b>19 (13,4%)</b> | <b>100 (70,4%)</b> |

**Figura 1.** Avaliação da presença de DNA plasmidial em bactérias Gram-negativas isoladas no setor de dietética de um hospital público. Eletroforese em gel de agarose 0,8 %. Controle positivo: DNA do plasmídeo pBT6 (5,8 kb), indicado pelo número 1. Os números de 2 a 11 correspondem ao DNA plasmidial dos isolados: 2- *Acinetobacter* sp, 3- *Enterobacter* sp, 4- *Escherichia* sp, 5-*Hafnia* sp, 6-*Klebsiella* sp, 7- *Salmonella* sp, 8- *Serratia* sp, 9- *Shigella* sp, 10- *Pseudomonas* sp, 11- *Yersinia* sp.



Ao correlacionar a presença de DNA plasmidial com a resistência dos isolados aos antibióticos testados, verificou-se que esta foi significativa ( $p < 0,001$ ) apenas para o antibiótico tetraciclina, porém essa tendência foi observada nos isolados resistentes aos demais antibióticos, uma vez que esses apresentaram maior frequência de presença de DNA plasmidial (Figura 2A). Já a correlação entre presença de DNA plasmidial e fontes dos isolados de bactérias Gram-negativas (Figura 2B), não foi significativa ( $p = 0,35$ ). Também não foi constatada diferença significativa entre os gêneros de bactérias Gram-negativas ( $p = 0,50$ ) e os grupos destas bactérias; enterobactérias, enteropatógenos e Gram-negativas aeróbias ( $p = 0,16$ ), em relação à presença de DNA plasmidial.

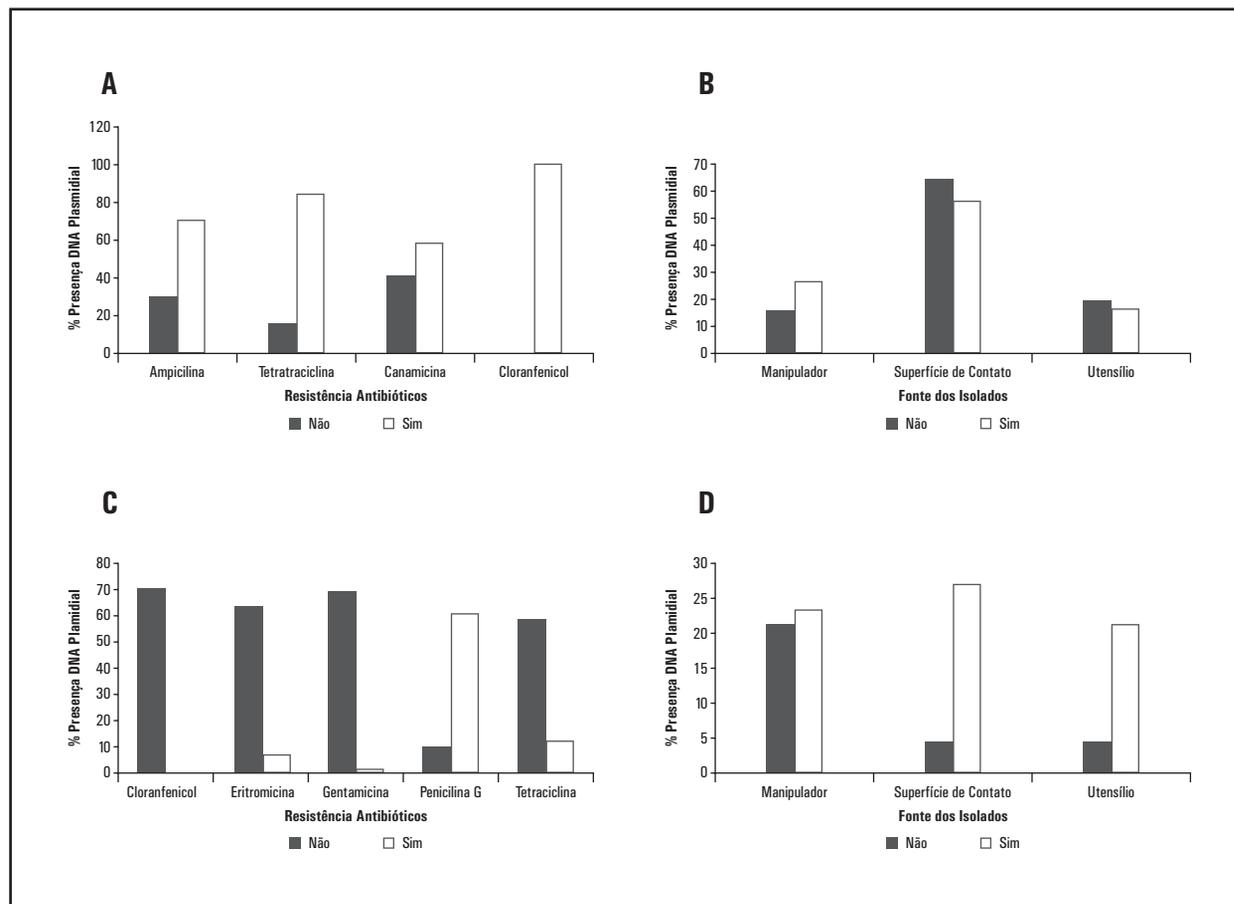
Verificou-se uma frequência significativamente maior ( $p < 0,001$ ) de DNA plasmidial nos isolados de *S. aureus* resistentes à tetraciclina, em relação aos isolados sensíveis ao referido antimicrobiano. Entretanto, esta diferença não foi significativa quando se analisou a resistência aos demais antibióticos avaliados ( $p > 0,05$ ) (Figura 2 C). Já na avaliação da presença de DNA

plasmidial em relação à fonte dos isolados, verificou-se diferença significativa ( $p < 0,001$ ), com menor número de isolados de utensílio e superfícies de processamento, em relação à ausência de DNA plasmidial (Figura 2 D).

## DISCUSSÃO

A variação da contagem de bactérias Gram-negativas e *S. aureus* entre valores menores que  $10^5$  até  $10^5$  UFC/mão ou  $\text{cm}^2$  nas amostras analisadas sinaliza uma inconstância nos procedimentos de higienização deste serviço de alimentação hospitalar. Grande parte dos manipuladores de alimentos (49%), a maioria dos utensílios (56%) e a quase totalidade das superfícies de processamento de alimentos (91%) apresentaram contagens de bactérias Gram-negativas acima das recomendações da APHA<sup>19</sup>, para contaminação por bactérias aeróbias mesófilas. Nota-se que *Klebsiella pneumoniae* foi a enterobactéria mais frequente em todas as amostras analisadas (35,4% do total). A contagem de *S. aureus* esteve acima da referida recomendação em 83% dos manipuladores de alimentos, 50% dos utensílios e 38% das superfícies de processamento.

**Figura 2.** Frequência de DNA plasmidial relacionados aos isolados de bactérias Gram-negativas (A) e *Staphylococcus aureus* (C) resistentes aos antibióticos em estudo e aos isolados de diferentes fontes de contaminação (B e D), respectivamente desses grupos bacterianos, no setor de dietética de um hospital público em Minas Gerais, 2009.



Recentemente, Ekrami e colaboradores encontraram realidade semelhante à constatada neste estudo em sete serviços de alimentação hospitalar, verificando contaminação por *S. aureus* e *K. pneumoniae* com presença expressiva desses micro-organismos em mãos de manipuladores (79,5%), superfícies de processamento (71,4%), vestiário (61,1%) e equipamentos (57,8%). Ademais, este estudo verificou a presença de bactérias Gram-negativas em 50% das mãos manipuladores de alimentos.<sup>22</sup>

Os resultados de contagens bacterianas observadas em mãos de manipuladores de alimentos requerem atenção, pois manipuladores representam uma das principais vias de contaminação de alimentos produzidos em larga escala, chegando a atingir 26% das causas e dos surtos de doenças causadas pela ingestão de alimentos.<sup>3</sup> A contaminação das mãos dos

manipuladores de alimentos por enterobactérias indica falhas quanto às boas práticas de higiene pessoal, pois essas bactérias normalmente não fazem parte da microbiota residente.<sup>23</sup> Além disso, a elevada porcentagem de manipuladores de alimentos portadores de *S. aureus* indica ineficiência no procedimento de sanitização das mãos praticados neste serviço de alimentação e pode possibilitar a contaminação dos alimentos durante o processamento com micro-organismos potencialmente patogênicos, uma vez que 98,6% dos isolados *S. aureus* foram confirmados como coagulase positivo. Este quadro ainda denota aspectos importantes, como o carreamento de enterobactérias e *S. aureus* nas mãos de manipuladores como parte da microbiota transitante e a possibilidade de *S. aureus* ser disseminado no ambiente do serviço de alimentação hospitalar como integrante da microbiota residente.<sup>24</sup>

A contaminação verificada nas superfícies de processamento de alimentos e nos utensílios, apontou condições insatisfatórias de boas práticas de higienização, indicando necessidade de intervenção para adotar melhorias. Ressalta-se que os itens amostrados têm sido incriminados, isoladamente ou associados com outros fatores, como causa de surtos de intoxicações e infecções alimentares ou em alterações de alimentos processados.<sup>25</sup> A contaminação cruzada pode ocorrer por meio de manipuladores e das superfícies de contato com alimento e é uma causa frequente da presença de patógenos em alimentos. Assim, placas de altileno para cortes, facas e recipientes constituem veículos comuns de transmissão de bactérias causadoras de doenças de origem alimentar.<sup>26</sup>

Adicionalmente, a contaminação de superfícies de processamento e utensílios por enterobactérias e outras bactérias Gram-negativas e por *S. aureus* pode representar riscos de contaminação dos alimentos, pela sobrevivência nesses ambientes em função da formação de biofilmes. Young e colaboradores<sup>25</sup> verificaram que patógenos como *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium podem apresentar diferentes formas de adesão, pela formação de biofilmes em superfícies de processamento de alimentos, em função especialmente da umidade relativa. Porém, também verificaram que um processo de higienização, com sanitizantes a base de álcool é efetivo no controle da contaminação por esses micro-organismos por evitar a formação de biofilmes nessas superfícies.

Os isolados encontrados no presente estudo foram citados em revisão recente, como principais agentes causadores de infecção hospitalar veiculados por alimentos destinados a pacientes em vulnerabilidade imunológica.<sup>22</sup> Adicionalmente, a *Antimicrobial Availability Task Force* (AATF) da *Infectious Diseases Society of America* identificou seis micro-organismos ou grupos microbianos de maior relevância no que concerne à resistência a antibióticos no ambiente hospitalar, incluindo: *Acinetobacter baumannii*, Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*,

*S. aureus*, *Enterococcus faecium* e *Aspergillus* spp, sendo parte desses micro-organismos identificados nas amostras deste estudo.<sup>27</sup>

A veiculação de micro-organismos por alimentos preparados em serviços de alimentação hospitalar tem um significado importante, pois muitos deles, que são causas infrequentes de doenças em indivíduos sadios, podem se tornar causas frequentes de doenças em pacientes hospitalizados. Além disso, contaminantes de alimentos com resistência a antibióticos podem estar presentes e ser fonte de plasmídeos de resistência. Isso pode acarretar a disseminação de plasmídeos de resistência no ambiente hospitalar, contribuindo assim para o insucesso de terapias antimicrobianas. Aponta-se ainda a possibilidade de os micro-organismos resistentes persistirem nas mãos, objetos inanimados, superfícies e ambientes e de serem transmitidos das mãos para superfícies e ambientes quando os profissionais não exercitam o hábito da higiene das mãos, perpetuando assim a cadeia de transmissão.<sup>28</sup>

A maior prevalência de resistência entre os isolados de bactérias Gram-negativas foi ao antibiótico tetraciclina e está pode estar relacionada ao uso terapêutico desse antibiótico e também a sua utilização como profilático e promotor de crescimento para animais.<sup>28</sup> A resistência a tetraciclina ocorre em bactérias Gram-negativas, pela atividade de efluxo de proteínas codificadas, geralmente, em genes localizados em plasmídeos ou transposons.<sup>29</sup> A prevalência de resistência a antibióticos apresentada pelos isolados de *S. aureus* seguiu a ordem de descoberta dos mesmos para fins terapêuticos. De acordo com Davies<sup>28</sup>, a introdução de penicilina no tratamento de infecções humanas foi seguida, em poucos anos, pela introdução de tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol. De acordo com Swartz<sup>29</sup>, *S. aureus* tem adquirido plasmídeos com genes que codificam  $\beta$ -lactamases, que são responsáveis por mais de 90% de resistência a penicilina G.

O quadro de resistência verificado, cerca de metade dos isolados de bactérias Gram-negativas e mais de 80% dos isolados de *S. aureus*, endossa a assertiva de que a resistência bacteriana a antimicrobianos é um grave problema de saúde

pública para o qual têm sido propostas diversas iniciativas de controle. Por exemplo, no Brasil, foi instituída em 2010 uma resolução que dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação, onde a dispensação desses só pode ser realizada mediante receita de controle especial.<sup>30</sup>

As ocorrências apenas de mutações cromossômicas não têm explicado a rápida aquisição de genes de resistência a antibióticos verificada entre as bactérias. Têm sido estabelecidos que plasmídeos são particularmente importantes na evolução de bactérias resistentes a antibióticos. Ademais, pesquisadores sugerem que a transferência de plasmídeos que carregam genes de resistência facilita a transmissão gênica horizontal de resistência entre as bactérias.<sup>6,7,8</sup> Alimentos parecem ser uma fonte efetiva para a aquisição, por seres humanos, de bactérias resistentes, mas a extensão e as consequências reais desta exposição ainda não estão suficientemente investigadas.<sup>10,11</sup>

Outra preocupação constante é o uso indevido de grandes quantidades de antibióticos na agricultura, como promotores de crescimento em rações para animais e outros objetivos não

terapêuticos. Apesar de uma proibição sobre o uso de antimicrobianos em alimentos para animais na Europa, cerca de metade dos antibióticos produzidos em todo o mundo não são para uso humano. Consequentemente, surtos graves de infecção alimentar causados por *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *C. jejuni* e *Campylobacter coli* multirresistentes presentes em vegetais contaminados, ovos, aves e carne estão se tornando mais comuns no mundo inteiro.<sup>28</sup>

Acredita-se que a compreensão desta realidade ratifica a necessidade de participação e co-responsabilização de todos no processo de controle desta situação, contemplando práticas individuais e coletivas, institucionais e nacionais, no âmbito de vários setores: agricultura, pecuária, comunidades e hospitais. Adicionalmente, ressalta-se que, um rigoroso e sistemático monitoramento dos riscos de origem alimentar tem que ocorrer no ambiente hospitalar, no qual a adoção de Boas Práticas de Manipulação de Alimentos é estratégico e eficaz, no controle da disseminação de bactérias resistentes a antibióticos no setor de dietética hospitalar.

## REFERÊNCIAS

1. Amson VG, Haracemiv SMC, Masson, ML. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. *Ciência e Agrotecnologia*. 2006; 30(6), 1139-1145.
2. Motta SPO, Flint S, Perry P e Noble A. Consumer contribution to food contamination in Brazil: modelling the food safety risk in the home. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2014;17(2), 154-165.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2008.
4. Lues JFR, Van Tonder I. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. *Food Control*. 2007; 18(4): 326-332.
5. Andremont, A. Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *American Society for Microbiology (ASM) News*. 2003; 69 (12): 601-607.
6. Davies J, Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010; 74: 417-433.
7. Caumo, K, Duarte, M, Cargni ST, Ribeiro, VB, Tasca T, Macedo AJ. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*. 2010; 11(16): 89-188.
8. Herrera-León S, González-Sanz R, Herrera-León L, Echeita MA. Characterization of multidrug-resistant Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance mechanisms in Spain. *Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66(2): 287-290.
9. WHO. World Health Organization. Core components for infection prevention and control programs. Assessment tools for IPC programmes. Geneve, WHO: 2011. World Health Organization (WHO). Prevention of hospital-acquired infections.
10. Blanc V, Mesa R, Saco, M. ESBL-and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Veterinary Microbiology*. 2006; 118 (3-4): 299-304.

11. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC, Peixe L. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008; 62: 296-302.
12. Bezanson GS, Macinnis R, Potter G, Hughes T. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 127(1-2): 37-42.
13. Fàbrega A., Sánchez-Céspedes J, Soto S, Vilaj. Quinolone resistance in the food chain. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008; 31(4): 307-315.
14. Alekshun MN, Levy BS. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007; 128: 1037-1050.
15. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 42(2): S82-S89.
16. Evans HL, SN Lefrak, Lyman J. Cost of Gram-negative resistance. *Critical Care Medicine*. 2007; 1: 89-95.
17. Plano MRA, Di Noto AM, Firenze A, Sciortino S, Mammìna C. Antibiotic-Resistant Gram Negative Bacilli in Meals Delivered at a General Hospital, Italy. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009, doi:10.1155/2009/476150.
18. Sveum WH, Moberg LJ, Rude, RA, Frank JF. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, Speck ML. (Eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: APHA, 1992. cap. 3, p. 51-74.
19. DOWNES, F. P.; ITO K (Eds.). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4 ed. Washington: American Public Health Association. 2001.
20. CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard M100-S25. Clinical and Laboratory Standard Institute; 2015.
21. Maniatis T, Goodbourn S, Fischer JA. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*. 1987; 236(4806): 1237-1245. DOI: 10.1126/science.3296191.
22. Ekrami AR, Kayedani A, Jahangir M, Kalantar E, Jalali M. Isolation of common aerobic bacterial pathogens from the environment of seven hospitals, Ahvaz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2011; 4(2): 75-82.
23. Mundy LM. Contamination, acquisition, and transmission of pathogens: implications for research and practice of infection control. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 2008; 29(7): 590-602.
24. Jumaa PA. Hand hygiene: simple and complex. *Int J Infect Dis*. 2005; 9 (1):3-14.
25. BAS São José JFB. Microbiological contamination in food service: importance and control. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição* 2012; 37(1): 78-92.
26. Young MB, Seung YB, Baek SYL. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 2012; 153: 465-473.
27. Talbot GH, Bradley J, Edwards JE Jr, Gilbert D, Scheld M, Bartlett JG. Bad Bugs Need Drugs: An update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*. 2006; 42(7): 657-668.
28. Davies, J. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Reports*. 2007; 8(7).
29. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 2009; 78: 119-146.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 20, de 5 de maio de 2011.