

**REVISTA TRÓPICA: Ciências Agrárias e Biológicas****Estudo *in vitro* da ação de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre *Enterococcus faecalis***Mateus de Oliveira Negreiros¹, Jeverson Frazzon¹, Ana Paula Guedes Frazzon¹¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre - RS. ana.frazzon@ufrgs.br

Resumo: Enterococos são cocos Gram-positivos, membros da microbiota humana e animal, sendo também encontrados em alimentos, solo e água. A resistência de enterococos a antibióticos têm sido muito estudada em amostras alimentares, ambientais e clínicas, porém poucos relatos avaliam a ação de biocidas sobre esses microrganismos. O hipoclorito de sódio (NaOCl) é um desinfetante muito utilizado na indústria de alimentos para eliminar microrganismos existentes em superfícies do processo de fabricação. O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de duas concentrações de NaOCl (2,5% e 8,5%) sobre vinte e dois *Enterococcus faecalis* isolados de carne de frango e correlacionar com o perfil de resistência antimicrobiana dos isolados. A sensibilidade das amostras de enterococos frente às diferentes concentrações de NaOCl foi realizada através da técnica dos cilindros carreadores de aço inox tipo 304. Dois isolados (9,09%) apresentaram crescimento após a exposição à concentração 8,5% de NaOCl e cinco (23%) na concentração de 2,5%. Não foi encontrada relação entre tolerância ao biocida e o perfil resistência. É importante salientar que alguns mecanismos de tolerância aos biocidas podem ser transferíveis para outras células bacterianas e se tornar um grande problema de saúde pública.

Palavras-chave: enterococos, tolerância, hipoclorito de sódio.

In vitro* study of different concentrations of sodium hypochlorite in *Enterococcus faecalis

Abstract: Enterococci are Gram-positive cocci, members of the microbiota and feed, also found in food, soil and water. The resistance of enterococci to antibiotics has been widely studied in food samples, environmental and clinical, however, few reports have evaluated the action of biocides on this microorganisms. Sodium hypochlorite (NaOCl) is a disinfectant widely used in the food industry to eliminate bacterial on surfaces of the manufacturing process. The aim of this study was to investigate the effect of two concentrations of NaOCl (2.5% and 8.5%) over twenty-two *Enterococcus faecalis* isolates from chicken meat poultry and correlate with the antimicrobial

resistance profile of isolates strains. The sensitivity of the samples enterococcos against the different concentrations of NaOCl was performed through the cylinder carriers of type 304 stainless steel test. Two isolates (9.09%) showed grow after exposure to a concentration of 8.5% NaOCl and five (23%) at a concentration of 2.5%. No relationship was found between biocide tolerance and resistance profile. It is noteworthy that some mechanisms of tolerance to biocides may be transferable to other bacterial cells and become a major public health problem in the future.

Keywords: enterococci, tolerance, sodium hypochlorite.

Introdução

Os representantes do gênero *Enterococcus* são membros da microbiota do trato gastrointestinal de homens e animais, sendo também encontrados em alimentos, água e solo (Riboldi et al., 2009; Cassenego et al., 2011; Valenzuela et al., 2008). Atualmente, são conhecidas mais de 54 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus*, sendo que *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* representam cerca de 80 a 90% e 5 a 15% das causas de infecções clínicas em humanos, respectivamente (Euzéby, 2014; d'Azevedo et al., 2006). Esses microrganismos são tolerantes ao calor e a cloreto de sódio e podem crescer em altas concentrações de sais biliares. Consequentemente espera-se que eles sejam resistentes a desinfetantes físicos e químicos (Fraise, 2002).

Uma característica importante desses microrganismos é a resistência intrínseca a uma gama de antimicrobianos, como as penicilinas semisintéticas, cefalosporinas, baixos níveis de aminoglicosídeos e clindamicina. Além disso, também possuem a capacidade de aquisição de genes de resistência, o que pode ocorrer por conjugação ou mutações no DNA, apresentando resistência adquirida a antibióticos como cloranfenicol, eritromicina, altos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, tetraciclina, fluorquinolonas e vancomicina (Murray, 1990; Kayser, 2003). Por sua ampla distribuição em animais e no ambiente, *E. faecalis* e *E. faecium* são utilizados como indicadores de contaminação fecal e como índice de saneamento (Keeratipibul et al., 2010).

Desenvolvimento

A carne, principalmente a de frango, quando fresca serve como excelente substrato para o microrganismos. As operações de abate como a depena, a evisceração e o arrefecimento em tanques de água têm sido considerados a maior fonte de contaminação em carcaças de aves (Cânoa, 2008; Kraszczuk, 2010). A contaminação pode ser a principal responsável tanto por perdas econômicas, provocadas pela deterioração da carne, como também pelos problemas ligados a saúde do

consumidor, em função da ingestão de bactérias patogênicas ou toxinas por elas produzidas. O local de abate e manipulação da carne deve seguir normas higiênicas, como a desinfecção das superfícies no abate com hipoclorito de sódio (NaOCl) ou quaternário de amônia (Silva et al., 2001).

A presença de *Enterococcus* no trato gastrointestinal de animais pode torná-lo um potencial contaminante da carne durante o abate. *E. faecalis* predomina entre as espécies isoladas de amostras de frango em abatedouros de aves (Franz et al., 2003) e também está associada a carnes processadas (Moreno et al., 2006). Keeratipibul et al. (2010), estudando a prevalência de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. em produtos de carne de frango, encontraram a presença desses microrganismos em superfícies que entram em contato com a carne. Estudos têm indicado uma incidência de *Enterococcus* em produtos cárneos que pode alcançar até 100% (Hayes et al., 2003; MacGowan et al., 2006). Em estudo realizado no Brasil em 2008, a prevalência de *Enterococcus* foi de 60% em produtos à base de carne (Gomes et al., 2008). A cadeia alimentar pode ser uma fonte importante de disseminação de enterococos resistentes ou de seus genes para as bactérias da microbiota do trato gastrointestinal de humanos.

Sabe-se que ao menos alguns mecanismos gerais responsáveis pela resistência a antibióticos são também aplicáveis a biocidas, existindo a possibilidade de resistência cruzada entre antibióticos e biocidas (Russel, 2002). Embora a resistência bacteriana a antibióticos seja bem estudada, apenas poucos relatos estão disponíveis sobre a ação de desinfetantes contra microrganismos (Guimarães et al., 2000). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de susceptibilidade de *E. faecalis* isolados de carne de frango frente a concentrações de 2,5% e 8,5% de NaOCl e correlacionar com a resistência a agentes antimicrobianos.

Vinte e dois *E. faecalis* isolados de amostras de carne de frango selecionados da Bacterioteca do Instituto de Ciências Básicas da Saúde do UFRGS foram utilizados nesse estudo. Todos os isolados haviam sido previamente identificados em espécie através de testes bioquímicos e confirmados para o gênero por PCR utilizando o primer *tuf* (Frazzon et al., 2010). Os isolados resistentes foram analisados quanto ao perfil de susceptibilidade a antibióticos pelo Método de Difusão em Disco e apresentaram perfil de resistência aos seguintes agentes antimicrobianos: Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina e Tetraciclina (tabela 1).

A susceptibilidade das amostras de enterococos frente às diferentes concentrações de hipoclorito de sódio foi realizada através da técnica dos cilindros carreadores preconizada pela Associação of Official Analytical Chemists International utilizada pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Esse método consiste no uso de dez cilindros de aço inox tipo 304 por desinfetante, os quais previamente esterilizados por autoclavagem. A seguir, os cilindros foram mergulhados em uma suspensão bacteriana de densidade óptica (OD_{600}) 0.4 a 0.66 em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI-Himedia Laboratories Ltd., Índia). Após 15 minutos, os cilindros

foram removidos e deixados para secar a 37°C por 40 min. Os cilindros carreadores contendo os enterococos foram mergulhados em uma solução de 2,5% ou 8,5% de NaOCl ou solução salina (controle positivo) e incubados por 10 min. à temperatura ambiente, como preconizado pelo fabricante. Transcorrido esse tempo, os cilindros foram transferidos para uma solução neutralizadora de 0,6% de tiosulfato de sódio por 40 min. Após a neutralização, cada cilindro foi colocado em um tubo contendo caldo de infusão de cérebro e coração (BHI-Himedia Laboratories Ltd., Índia) e incubado a 37°C por 48h. O resultado positivo era baseado na turbidez apresentada nos tubos após o período de incubação, e o isolado era considerado tolerante ao desinfetante quando pelo menos um dos tubos contendo um cilindro apresentava crescimento.

Para verificar se nenhuma das soluções utilizadas nos experimentos estava contaminada, foi realizado um teste das soluções. Com o auxílio de uma alça de platina, estriou-se, o desinfetante NaOCl nas concentrações de 2,5% e 8,5%, a solução de tiosulfato de sódio e a solução salina utilizada em cada teste em meio ágar BHI. O período de incubação foi o mesmo do teste, 48h a 37°C.

A comparação entre o perfil de isolados suscetíveis e não suscetíveis aos agentes antimicrobianos e tolerância aos desinfetantes foi realizada por meio do teste de qui-quadrado.

Um total de 22 *E. faecalis* isolados de amostras de frango foram avaliados quanto a susceptibilidade frente as concentrações de 8,5% e 2,5% de NaOCl. Os resultados estão demonstrados na Tabela 1. A concentração de 8,5% de NaOCl se mostrou mais eficiente em inibir o crescimento dos isolados, entretanto dois isolados (9,09%) apresentaram um ou mais carreadores positivos após a exposição ao hipoclorito de sódio. A concentração de 2,5% se mostrou menos eficiente que a de 8,5%, onde cinco isolados (23%) apresentaram crescimento após a exposição ao biocida. Não foi encontrada diferença significativa entre as duas concentrações testadas ($p > 0.05$). Todos os isolados cresceram na presença da solução salina.

O cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água e dos alimentos, bem como para aumentar a vida útil dos produtos processados (Andrade et al., 1996). O ácido hipocloroso (HClO) pode causar a oxidação dos grupos sulfidríla (-SH) de certas enzimas que participam da via glicolítica e o rompimento de sistemas vitais, como transportadores de membrana e síntese de DNA (Keeratipibul et al., 2010). Arruda (2007) observou que isolados de *E. faecalis* foram inativados após a exposição à NaOCl na concentração de 2,5% por 10 minutos. Outros estudos também mostraram a eficácia do NaOCl sobre *E. faecalis* e outros microrganismos (Sassone et al., 2008; Gomes et al., 2010; Ibrahim et al., 2008). Ayhan et al. (1999), testaram duas concentrações de NaOCl (0,5% e 5,25%) sobre microrganismos comumente encontrados em sistemas de canais radiculares, entre eles *E. faecalis*, e

verificaram que a maior concentração de NaOCl resultou em diminuição significativa no crescimento da bactéria.

Tabela 1. Susceptibilidade dos isolados alimentares de *Enterococcus faecalis* a concentrações de 2,5% e 8,5% de NaOCl.

ISOLADOS	2,5% NaOCl	8,5% NaOCl	Salina	Perfil de resistência
E5	-	-	+	Eri+Gen
E7	-	-	+	S
14	+	-	+	Eri+Tet
15	-	-	+	Eri+Tet+Clo
19	+	+	+	Tet+ Clo
22	+	-	+	Eri+Tet+Cip
23	-	-	+	Tet+ Clo
24	+	+	+	Tet+ Clo
25	-	-	+	Eri+Tet
26	-	-	+	Eri+Tet+Clo
27	+	-	+	Eri+Clo+Tet
30	-	-	+	Eri+Tet+Clo
32	-	-	+	Tet+ Clo
33	-	-	+	Tet+Clo
34	-	-	+	Tet+ Clo
35	-	-	+	Tet+ Clo
38	-	-	+	Tet
39	-	-	+	Tet+ Clo
40	-	-	+	Tet
41	-	-	+	Tet
42	-	-	+	Tet+ Clo
43	-	-	+	Tet+ Clo+Cip

Legenda: eritromicina (Eri), ciprofloxacina (Cip), cloranfenicol (Clo), tetraciclina (Tet) e gentamicina (Gen). +: um ou mais carreadores apresentaram crescimento em BHI após a exposição ao biocida, -: nenhum carreador apresentou crescimento em BHI após a exposição ao biocida.

Um achado muito importante no presente estudo foi a identificação de isolados de *E. faecalis* tolerantes as concentrações de 2,5% e 8,5% de NaOCl. Segundo Fraise (2002), os possíveis mecanismos de tolerância a biocidas em cocos Gram-positivos incluem bombas de efluxo, alteração do sítio alvo e mudanças na estrutura da parede celular. Diversos fatores podem influenciar a susceptibilidade dos microrganismos presentes em uma linha de abate de frango. Uma das desvantagens da utilização do cloro é que este biocida é rapidamente inativado pela matéria orgânica, tendo escassa atividade quando aplicado a superfícies de carcaças e de equipamentos sujos por resíduos durante o processo (Cânoa, 2008). Além disso, concentrações residuais de desinfetantes podem agir como um foco para sobrevivência de microrganismos ou para uma gradual ou rápida seleção de bactérias tolerantes a biocidas (Russel, 2002). Segundo Sander (2002), bactérias apresentam tolerância após uma exposição prolongada aos desinfetantes, e bactérias do mesmo gênero e espécie podem apresentar diferenças na sensibilidade frente ao mesmo desinfetante. Na indústria de alimentos, cepas tolerantes a biocidas tornam-se difíceis ou impossíveis de serem eliminadas, tornando-se uma potencial fonte de contaminação que pode levar

a deterioração dos alimentos ou a transmissão de doenças. Até o momento, no Brasil não existem muitos estudos avaliando o perfil de tolerância de cepas de enterococos aos biocidas.

Os isolados que apresentaram tolerância as concentrações de 8,5% e 2,5% de NaOCl também demonstravam resistência a antimicrobianos, entretanto nenhuma relação pode ser feita com o perfil de resistência e a tolerância ao NaOCl. Romão et al. (2005), comparando dois grupos de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* (susceptíveis e poucos susceptíveis a um desinfetante) não encontraram diferenças entre os grupos em relação a resistência a antibióticos. Do mesmo modo, Guimarães et al. (2000) testaram isolados de *Enterococcus* (susceptíveis e resistentes a gentamicina) obtidos de sítios cirúrgicos de infecção e não observaram qualquer relação entre susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes. Outros estudos também não observaram relação entre susceptibilidade a antibióticos e desinfetantes (Rutala et al., 1997; Bradley et al., 1996). A tolerância a biocidas é mediada por mecanismos similares àqueles que medeiam à resistência a antibióticos, incluindo inativação ou modificação da droga, alteração do sítio alvo e alteração da concentração devido à diminuição da permeabilidade ou aumento do efluxo. Fraise (2002) relata que é inevitável que cepas de enterococos apresentem resistência intrínseca a agentes químicos, embora não seja clara a relação entre resistência antimicrobiana e tolerância aos agentes químicos.

Considerações finais

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo e detém a condição de líder mundial de exportação, fato que coloca o país em posição de destaque e aumenta a responsabilidade sobre a qualidade e a segurança sanitária dos nossos produtos. Nesse estudo, enterococos isolados de carne de frango mostraram-se tolerantes a um biocida comumente utilizado nas indústrias de alimentos. Ao nosso conhecimento, no Brasil não existem estudos que avaliam a tolerância de *E. faecalis* isolados de carne de frango a diferentes concentrações de NaOCl. É importante salientar que alguns mecanismos de tolerância aos biocidas podem ser transferíveis para outras células bacterianas e se tornar um grande problema no futuro.

Referências

ANDRADE, N.J.; MACEDO, J.A. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 182 p., 1996.

ARRUDA, T.T.P. Perfil de susceptibilidade de cepas planctônicas e biofilmes de *Enterococcus faecalis* frente a desafios antimicrobianos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) ó Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

AYHAN, H.; SULTAN, N.; CIRAK, M.; RUHI, M. Z; BODUR, H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **International Endodontic Journal**, v.32, p. 99-102, 1999.

BRADLEY, C. R.; FRAISE, A. P. Heat and chemical resistance of enterococci. **Journal of Hospital Infection** 34, 191-196, 1996.

CÂNNOA, J.M.H. Requisitos para a implantação do HACCP em matadouros de aves. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) ó Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

CASSENEGO, A.P.V.; dØ AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; VAN DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Species distribution and antimicrobial susceptibility of Enterococci isolated from broilers infected experimentally with *Eimeria* spp and fed with diets containing different supplements. **Brazilian Journal of Microbiology** 42: 480-488, 2011.

d'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 48, 11-16, 2006.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature ó Genus Enterococcus. Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>. Acesso: 05 Dezembro/2014.

FRAISE, A.P. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement** 92, 158S-162S, 2002.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHELEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology** 88, p.105ó 122, 2003.

FRAZZON, A. P. G.; GAMA, B.A.; HERMES, V.; BIERHALS, C.G.; PEREIRA, R.I.; GUEDES, A.G.; dØ AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, J. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by tet(M) and tet(L) genes in Enterococcus spp. isolated from food in Southern Brazil. **World J Microbiol Biotechnol** 26:365ó370, 2010.

GOMES, B.C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I.C.V.; DARINI, A.L.C.; FELIS, G.E.; SECHI, L.A.; FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINS, E.C.P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology** 25, 668-675, 2008.

GOMES, C.C.; CAMÕES, I.C.G.; FREITAS, L.F.; PINTO, S. de S.; SARAIVA, S.M.; SAMBATI, S. Avaliação do hipoclorito de sódio e da clorexidina na desinfecção de cones de guta-percha. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**, 22(2): 94-103, 2010.

GUIMARÃES, M.A.; TIBANA, A.; NUNES, M.P.; dos SANTOS, K.R.N. Disinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian hospital bacterial isolates. **Brazilian Journal of Microbiology** 31:913-1999, 2000.

HAYES, J.R.; ENGLISH, L.L.; CARTER, P.J.; PROESCHOLDT, T.; LEE, K.Y.; WAGNER, D.D.; WHITE, D.G. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 7153-7160, 2003.

IBRAHIM, N.Z.; ABDULLAH, M. Antimicrobial evaluation of sodium hypochlorite and ozonated water on *E. faecalis* biofilm. **Annal Dent Univ Malaya** 15(1): 20-26, 2008.

KAYZER, F. H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Int. J. Food Microbiol.** 88, 255-262, 2003.

KEERATIPIBUL, S.; MEETHONG, S.; TECHARUWICHIT, P.; THEPHUTTEE, N. Prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in a Thai frozen cooked chicken plant, and modeling of the cleaning and sanitizing procedure. **Food Control** 21, 1104-1112, 2010.

KRASZCZUK, V. Verificação do processo de higienização pré-operacional de um abatedouro de aves. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

MACGOWAN, L.L.; JACKSON, C.R.; BARRET, J.B.; HIOTT, L.M.; FEDORKA-CRAY, P.J. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. **Journal of Food Protection**. v.69, n.12, p.2976-2982, 2006.

MORENO, M. R. F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology** 106, 1 ó 24, 2006.

MURRAY, B.E. The time and life of *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Vol. 3, No. 1, p. 46-65, 1990.

RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; d'AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp isolated from food in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology** 40: 125-128, 2009.

ROMÃO, C. M. C. P. A.; de FARIA, Y. N.; PEREIRA, L. R.; ASENSI, M. D. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 100(5): 541-548, 2005.

RUSSEL, A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: Introduction. **Journal of Applied Microbiology** Symposium Supplement 92, 1S63S, 2002.

RUTALA, W. A.; STIEGEL, M. M.; SARUBBI, F. A.; WEBER, D. J. Susceptibility of antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant hospital bacteria to disinfectant. **Infec Control Hosp Epidemiol** 18: 417-421, 1997.

SANDER, J.E.; HOFACRE, C.L.; CHENG, I-H.; WYATT, R.D. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Disiases**, Washington, v.46, p 997-100, 2002.

SASSONE, L.M.; FIDEL, R.A.S.; MURAD, C.F.; FIDEL, S.R.; HIRATA JR., R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. **Aust Endod J** 34: 19624, 2008.

SILVA, J. A.; SOARES, L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão - **Revista TeC Carnes** - Campinas, SP, v.3, n.1, p.19-26, 2001.

VALENZUELA, A.S.; OMAR, N.B.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; ORTEGA, E.; CAÑAMERO, M.M.; GALVEZ, A. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco:

Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. **Food and Chemical Toxicology**. V.46, p. 2648-2652, 2008.