

PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* COLETADOS EM AMBIENTE DE ORDENHA FRENTE A ANTIMICROBIANOS

**JULIANA FERNANDES ROSA¹; GREYCE SILVEIRA MELLO²; THAMÍRIS
PEREIRA DE MORAES³; CLÁUDIO DIAS TIMM⁴; HELENICE DE LIMA
GONZALEZ⁵; NATACHA DEBONI CERESER⁶**

¹ Universidade Federal de Pelotas – ju_fernandes.r@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – greycemello@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – thamiris.p@outlook.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – claudiotimm@hotmail.com

⁵ Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – natachacereser@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a antimicrobianos é uma preocupação crescente na saúde pública mundial por motivos que variam desde a elevada variedade de agentes infecciosos envolvidos, até a proliferação exacerbada dos mesmos (WHO, 2014). O uso indiscriminado e abusivo de antimicrobianos em animais de produção, principalmente os utilizados na terapêutica contra mastite em bovinos, pode levar a perpetuação de cepas resistentes (EMBRAPA, 2015), podendo contribuir ainda para a eliminação de resíduos desses medicamentos e seus metabólitos em produtos de origem animal, representando um risco para a saúde do consumidor, que além da resistência à antimicrobianos, pode desenvolver reações de hipersensibilidade (BEYENE, 2016).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são uma das mais importantes em casos de resistência a antimicrobianos, sendo frequentemente isoladas em alimentos (KONEMAN, et al., 2001). São micro-organismos colonizadores da pele e fossas nasais de animais e seres humanos, o que confere facilidade de veiculação para diferentes ambientes, entre eles a ordenha, infectando os seres humanos, os animais e contaminando o leite (RAPINI et al., 2004).

Segundo TIMM et al. (2017), os *Staphylococcus* produtores de coagulase são os de maior importância em alimentos, devido à sua capacidade de síntese de enterotoxinas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo o *S. aureus* a espécie mais enterotoxigênica, responsável por cerca de 98% dos surtos de intoxicações alimentares atribuídas ao gênero (BELOTI et al., 2015).

Sabendo disso, o objetivo do trabalho foi determinar o perfil de resistência de isolados de *Staphylococcus aureus* coletados em amostras de leite cru e da pele dos tetos de vacas em ordenha frente aos antimicrobianos frequentemente utilizados na terapêutica contra a mastite bovina.

2. METODOLOGIA

Para o trabalho foram selecionados 9 isolados de *S. aureus* identificados pela técnica de multiplex PCR (reação da polimerase em cadeia), assim como uma cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) número 25923 do mesmo micro-organismo em estoque (ROSA et al., 2018), coletados previamente em 3 unidades produtoras de leite da região sul do Rio Grande do Sul, sendo 3 amostras da pele dos tetos de vacas e 6 de leite cru, identificados como fortes formadores de biofilme bacteriano por estudos ainda não publicados.

Visando a realização da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966), após a recuperação dos isolados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI - Merck

KGaA, Alemanha), os mesmos tiveram a sua turvação padronizada no equivalente a 0,5 da escala de McFarland, correspondendo a 0,132 de densidade óptica (D.O.) a 600nm em espectrofotômetro, e foram semeados sobre a superfície de placas de Pretri contendo ágar Müller-Hinton (Kasvi, Itália) com o auxílio de suabes estéreis para uma cobertura uniforme do inóculo.

Observando as principais classes de antimicrobianos indicadas para o tratamento de mastite bovina (EMBRAPA, 2015), foram utilizados para o estudo discos impregnados com os seguintes princípios ativos: penicilina (10 µg/disco), ampicilina (10 µg/disco), cefalotina (30 µg/disco) e cefoxitina (30 µg/disco) do grupo dos beta-lactâmicos; a neomicina (30 µg/disco) do grupo dos aminoglicosídeos; a enrofloxacina (5 µg/disco) e ciprofloxacina (5 µg/disco) do grupo das quinolonas; o trimetoprim (5 µg/disco) do grupo das sulfonamidas e a eritromicina (15 µg/disco) do grupo dos macrolídeos, que foram depositados na superfície do ágar Müller-Hinton em triplicata e incubados em estufa bacteriológica por 24 horas a 37°C para posterior leitura e medição dos halos de inibição, adotando-se a média entre os halos observados como resultado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Levando em conta as especificações publicadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015), apenas os antimicrobianos enrofloxacina, ciprofloxacina e o trimetoprim foram eficazes contra os isolados testados, assim como podemos observar na tabela 1.

Tabela 1: Resultado da suscetibilidade dos isolados de *S. aureus* testados frente aos princípios ativos utilizados pela técnica de difusão em disco.

Isolado	Antimicrobiano								
	PEN	AMP	CFL	CFO	NEO	ENO	CIP	TRI	ERI
110	^b R	R	R	R	^c S	S	S	S	R
112	R	R	R	R	S	S	S	S	R
115	R	R	R	R	R	S	S	S	R
487	R	R	R	R	R	S	S	S	R
488	R	R	R	R	R	S	S	R	R
489	R	R	R	R	S	S	S	S	R
628	R	R	R	R	R	S	S	S	R
629	R	R	R	R	R	S	S	S	R
633	R	R	R	R	S	S	S	S	R
ATCC 25923	R	R	R	S	R	S	S	R	R

^aPEN = penicilina; AMP= ampicilina; CFL= cefalotina; CFO= cefoxitina; NEO= neomicina; ENO= enrofloxacina; CIP=ciprofloxacina; TRI= trimetoprim e ERI= eritromicina.

^bR = Resistente; ^cS= Sensível

A enrofloxacina e a ciprofloxacina do grupo das quinolonas obtiveram atividade antimicrobiana sobre 100% dos isolados testados, resultado que pode ser atribuído à elevação do espectro de ação desse grupo de antimicrobianos pela adição de um átomo de flúor na década de 80 (DA SILVA e HOLLENBACH, 2010). Semelhante aos resultados achados, em São Paulo e Minas Gerais, 99,1% de amostras de leite caprino identificadas como *Staphylococcus* sp. também se mostraram sensíveis a enrofloxacina (SALABERRY et al., 2016). Os isolados também se mostraram 89% sensíveis ao trimetoprim, que quando usado em associação ao sulfametoxazol no Piauí, apresentou 100% de eficácia frente aos isolados de *S. aureus* isolados de queijo coalho e leite (PEREIRA et al., 2018).

A resistência de 100% dos isolados frente aos antimicrobianos beta-lactâmicos, representados pela penicilina, ampicilina, cefalotina e cefoxitina, pode

ser atribuída à produção de beta-lactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, impossibilitando a atividade antimicrobiana do fármaco pelos *S. aureus* testados (CHOQUE, 1993), ainda em concordância, outros autores também verificaram uma alta taxa de resistência de isolados identificados como *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. contra os beta-lactâmicos, em isolados de leite em Pernambuco (SILVA et al., 2012) e Minas Gerais (SANTOS et al., 2006).

Ainda, a resistência de 56% e 100%, verificada frente aos antimicrobianos neomicina e eritromicina, respectivamente, também foi verificada por DAL VESCO et al. (2017) e KAISER et al. (2015), ao testarem isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e de *S. aureus* obtidos em leite mastítico nas regiões sul e noroeste do Rio Grande do Sul.

A característica de multirresistência dos isolados frente aos antimicrobianos testados pode ser relacionada à uma possível pressão seletiva de antimicrobianos sofrida por esses isolados, além das características próprias dos mesmos, uma vez que todos foram identificados como fortes formadores de biofilme bacteriano, proporcionando um grande desafio aos princípios ativos testados.

4. CONCLUSÕES

Os 9 isolados de *Staphylococcus aureus* coletados em ambiente de ordenha se mostraram total ou majoritariamente sensíveis apenas aos antimicrobianos enrofloxacina e ciprofloxacina do grupo das quinolonas e o trimetoprim do grupo das sulfonamidas, o que evidencia a capacidade de multirresistência desses micro-organismos frequentemente encontrados na atividade leiteira, e a importância no seu controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUER, A. W.; KIRBY W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966
- BELOTI, Vanerli; REIS, Carla Golner; DA SILVA, Lívia Cavaletti Correa; NERO, Luiz Augusto; MOREIRA, Maria Aparecida Sacatamburio; FAGNANI, Rafael; TAMARINI, Ronaldo. **Leite: Obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Editora Planta, 2015. 417 p.
- BEYENE, T. Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health. **Journal of Veterinary Science and Technology**, Los Angeles, v. 7, n. 1, p. 285, 2016.
- CHOQUE, R. C. Antibióticos betalactâmicos. **Revista Sociedad Boliviana de Medicina Familiar**, La Paz, v. 3, n. 1, p. 91-97, 1993.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing, twentieth information supplement, document M100-S25. Wayne, PA, USA: CLSI, 2015.
- DA SILVA, J. M. B. & HOLLENBACH, C. B. Fluoroquinolonas X resistência bacteriana na medicina veterinária. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 363-369, 2010.
- DAL VESCO, J; SIEBEL, J. C.; SUZIN, G.O.; CERESER, N. D.; GONZALEZ, H. L. Monitoramento dos agentes causadores de mastite e a susceptibilidade aos antimicrobianos. **Revista Expressa Extensão**, Pelotas, v. 22, n. 1, p. 34-50, 2017.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Circular técnica Nº 108 de junho de 2015. Avaliação de informações técnicas contidas nas bulas dos antimicrobianos indicados para mastite bovina como método auxiliar na definição de protocolos de tratamento. EMBRAPA Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais 2015.

KAISER, T. S.; POSSEBON, K. F.; VIERO, L. M.; MARTINS, L. V. Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados em mastites bovinas na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. In: XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 2015. Disponível em: <https://www.revistas.unijui.edu.br/index.php/salaconhecimento/article/viewFile/5117/4297>

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR.; W. C. W. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

PEREIRA, C. T. M. et al. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 1957-1968, 2018.

RAPINI, L. S.; TEIXEIRA, J. P.; MARTINS, N. E. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, p. 130-133, 2004.

ROSA, J.F.; MELLO, G.S.; GONZALEZ, H.L.; DELL'OSBEL, F.; CERESER, N.D. Isolamento e identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva coletados em ambiente de ordenha. In: **ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO UFPEL**, 20., Pelotas, 2018. Disponível em: http://cti.ufpel.edu.br/siepe/arquivos/2018/CA_01133.pdf

SALABERRY, S. R. S.; SAIDENBERG, A. B. S.; ZUNIGA, E.; GONSALES, F. F.; MELVILLE, P. A.; BENITES, N. R. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 2, p. 336-344, 2016.

SANTOS, C. D. M; LEAL, G. S.; ROSSI, D. A. Frequência e suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isolados de leite de vacas com mastites recorrentes de rebanhos da região de Uberlândia – MG. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v. 12, n. 2, p. 83-88, 2006.

SILVA, E. R.; PEREIRA, A. M. G.; MORAES, W. S.; SANTORO, K. R.; SILVA, T. R. M. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 13, n. 3, p.701-711, 2012.

TIMM, Cláudio Dias; DE LIMA, Helenice Gonzalez; CERESER, Natacha Deboni. **Manual de Técnicas Microbiológicas em Leite e Derivados**. Pelotas: UFPel, 2017. 85 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial Resistance**. Global Report on Surveillance, 2014.