

Área: Ciência dos Alimentos

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS MULTIRRESISTENTES A
ANTIMICROBIANOS E FORMADORES DE BIOFILME ISOLADOS DE
AMBIENTE DE ORDENHA**

Daniela de Avila Silva Bohrz¹, Nathanyelle Soraya Martins de Aquino^{2,*}, Sara Souza Gehlen³, Edinara Silva de Lima⁴, Bruna Webber¹, Fernando Pilotto⁴, Laura Beatriz Rodrigues^{1,2,4}

¹PPGBioexp, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

²PPGCTA, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

³PPGCV, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS

⁴Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, RS

*E-mail: nathanyelleaquino@gmail.com

RESUMO – *Staphylococcus aureus* é o patógeno mais isolado da mastite bovina e um dos mais importantes causadores de doenças transmitidas pelos alimentos. Muitas infecções são causadas por linhagens de bactérias resistentes, sendo de extrema importância a preocupação com a resistência aos princípios ativos usados para tratamentos em humanos e animais. Outra característica importante dos *S. aureus* é a capacidade de formar biofilmes em superfícies bióticas e inertes, com implicações em saúde pública nas indústrias de alimentos. Este experimento avaliou a resistência antimicrobiana e a capacidade de formação de biofilmes de 15 cepas de *S. aureus* isoladas do processo de ordenha. Todas as amostras apresentaram perfil de multirresistência, com duas cepas resistentes a 100% dos fármacos e as demais resistentes a pelo menos 6 princípios ativos. O Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) variou de 0,5 a 1,0. Das 15 cepas, 100% foram resistentes a penicilina G, 93,34 % resistentes a oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% resistentes a doxiciclina e 80% gentamicina; 53,34% resistentes a ceftiofur, 33,34 % a neomicina. Destaca-se que 93,34% (14/15) foram resistentes a oxacilina (*S. aureus* meticilina-resistentes - MRSA) e, destas, 33,34% (05/15) também foram resistentes à vancomicina (*S. aureus* vancomicina-resistentes - VRSA). As cepas também foram avaliadas quanto à formação de biofilmes em diferentes temperaturas de incubação (3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C) e formaram biofilmes em pelo menos três temperaturas avaliadas, incluindo as temperaturas de refrigeração.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, mastite, multirresistência, antimicrobianos, biofilme.

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de *Staphylococcus aureus* em alimentos como leite e derivados representa um risco potencial em termos de saúde pública, principalmente devido à produção de enterotoxinas capazes de desencadear um processo de intoxicação (MARTIN, 2015). De acordo com os dados do Serviço de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequente em surtos com agente etiológico conhecido, representando 20% dos casos ocorridos nos últimos anos (BRASIL, 2013).

Este microrganismo é um dos principais agentes das mastites consideradas contagiosas, apresentando elevada incidência na maioria dos rebanhos leiteiros em vários países. Dentre as características que tornam esse microrganismo um dos principais agentes causadores de mastite, destaca-se a alta capacidade de invasão, que permite a infecção de regiões mais profundas da glândula mamária. Adicionalmente, ocorre formação de tecido fibroso no foco da infecção, formando "bolsões" de bactérias que dificultam a ação dos antibióticos no local da infecção (SALIMENA, 2014). A liberação do *S. aureus* causador de mastite contamina o leite que, consumido cru ou processado inadequadamente, pode contaminar os consumidores e causar doenças de origem alimentar.

A eliminação da mastite estafilocócica é o ideal, através de terapia apropriada durante a lactação, tratamento completo de vacas secas e descarte de animais com infecção crônica. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos e outros fármacos, assim como a utilização de doses não indicadas ou contínuas, geram uma pressão seletiva (COSTA, 2013; SALIMENA, 2014). A resistência antimicrobiana é o principal efeito colateral desta prática, selecionando bactérias, modificando a estrutura de comunidades bacterianas e induzindo uma evolução acelerada com consequências imprevisíveis para a saúde humana e animal (EFSA, 2014). Neste contexto, 15 amostras de *Staphylococcus aureus*, isoladas de diferentes pontos do ambiente de ordenha, foram analisadas quanto à resistência a antimicrobianos e capacidade de formação de biofilme.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF). Foram analisadas 15 amostras de *S. aureus* isolados de diferentes pontos do ambiente de ordenha em uma propriedade leiteira no norte do Rio Grande do Sul. Destes, 6 (seis) foram isolados de teteiras; 5 (cinco) de água do processo CIP; 2 (dois) do tanque de refrigeração; e 2 (dois) do leite do conjunto. Também foi testada a cepa padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

As culturas bacterianas foram semeadas testadas pela técnica de disco-difusão (CLSI, 2012) frente aos seguintes princípios ativos: Cefalexina 30 µg, Gentamicina 10 µg, Tetraciclina 30 µg, Oxacilina 1 µg, Neomicina 30 µg, Sulfazotrim 25 µg, Penicilina G 10 U, Amoxicilina + Ácido Clavulônico 30 µg, Vancomicina 30 µg, Cloranfenicol 30 µg, Doxiciclina 30 µg, Ceftiofur 30 µg. Utilizou-se o critério para multirresistência aos fármacos do National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS, 2012), que determina a multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. O índice de resistência múltipla a

antimicrobianos (IRMA) para cada amostra foi calculado conforme KRUMPERMAN (1983), onde IRMA= número de antibióticos resistentes / número total de antibióticos testados.

O método para detecção da formação de biofilme em superfície de poliestireno foi baseado em Rodrigues et al. (2010), com 6 (seis) repetições para cada *S. aureus* testado, em cada temperatura avaliada. As placas de poliestireno de 96 poços foram incubadas em $42\pm 1^\circ\text{C}$, $36\pm 1^\circ\text{C}$, $25\pm 1^\circ\text{C}$, $9\pm 1^\circ\text{C}$ e $3\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA a 550 nm. O valor da absorbância de cada amostra (DOa) foi obtido através da média aritmética dos valores dos 6 poços, comparado com a média da absorbância do TSB com 4% de glicose não inoculado (DO). Para determinar o grau de aderência foi utilizada a seguinte classificação: não aderente: $\text{DOa} \leq \text{DO}$; fracamente aderente: $\text{DO} < \text{DOa} \leq 2.\text{DO}$; moderadamente aderente: $2.\text{DO} < \text{DOa} \leq 4.\text{DO}$; fortemente aderente: $4.\text{DO} < \text{DOa}$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, todas as amostras de *Staphylococcus aureus* avaliadas apresentaram padrão de multirresistência, conforme descrito na Tabela 1. O Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) revelou alguns valores próximos ou iguais a 1,0.

Tabela 1 - Distribuição do padrão de resistência e Índice de Resistência Múltipla a Antimicrobianos (IRMA) de 15 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de diferentes pontos do fluxograma da obtenção do leite cru.

Padrão de resistência aos antimicrobianos	Número de amostras	Perfil de resistência	IRMA
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Neo, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	2	1	1,0
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Neo, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut	2	2	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	1	3	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut, Ctf	1	4	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Van, Amc, Sut	1	5	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	6	0,83
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Dox, Tet, Clo, Amc, Sut	3	7	0,75
Cfe, Oxa, Pen, Gen, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	8	0,66
Cfe, Pen, Gen, Neo, Tet, Clo, Amc, Sut	1	9	0,66
Cfe, Oxa, Pen, Tet, Clo, Amc, Sut, Ctf	1	10	0,66
Cfe, Oxa, Pen, Dox, Tet, Clo	1	11	0,5

Cfe = Cefalexina 30 µg, Oxa= Oxacilina 1 µg, Pen= Penicilina G 10 U, Gen= Gentamicina 10 µg, Neo= Neomicina 30 µg, Dox= Doxiciclina 30 µg, Tet= Tetraciclina 30 µg, Clo= Cloranfenicol 30 µg, Van= Vancomicina 30 µg, Amc= Amoxicilina + Ácido Clavulônico 30 µg, Sut= Sulfá + Trimetopim 25 µg, Ctf= Ceftiofur 30µg.

Os *S. aureus* isolados das teteiras demonstraram IRMA com valores de 0,66 a 1,0 e da água do CIP variaram de 0,5 a 1,0. Os microrganismos oriundos do leite apresentaram valores de 0,83 e os do tanque de

refrigeração foram de 0,66 a 0,83. De acordo com Krumperman (1983), IRMA $\geq 0,2$ caracteriza o fenômeno da múltipla resistência, indicando um risco para saúde pública, uma vez que o tratamento de enfermidades de animais e humanos fica dificultado. Como destacado por Bauer-garland et al. (2006), bactérias que apresentam multirresistência podem se disseminar mais rapidamente de um animal a outro e apresentar menor resposta ao tratamento com antimicrobianos. Os resultados encontrados nesse estudo para amostras de leite foram superiores ao relatado por Costa et al. (2013), onde o IRMA para *S. aureus* variou de 0 a 0,26, mas 18,15% das amostras testadas apresentaram IRMA $\geq 0,2$, caracterizando o fenômeno da múltipla resistência.

Em relação aos princípios ativos utilizados no teste, 100% (15/15) das amostras foram resistentes a penicilina G, 93,34 % resistentes a oxacilina, cefalexina, tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina + ácido clavulônico e sulfazotrim; 73,33% resistentes a doxiciclina e 80% gentamicina; 53,34% resistentes a ceftiofur, 33,34 % a neomicina. Taxas de resistência antimicrobiana em hospitais e sistemas de produção animal aumentaram consideravelmente durante as últimas décadas, tornando o tratamento das doenças ainda mais difícil (FRYE & JACKSON, 2013).

O debate recente sobre a elevada resistência microbiana observada na medicina humana e, particularmente, de linhagens metilina-resistentes (MRSA) de *S. aureus*, aumentou a preocupação sobre o uso de antimicrobianos. No presente estudo 93,34% (14) das amostras apresentaram resistência à oxacilina, demonstrando característica de MRSA. As cepas resistentes a oxacilina também podem ser denominadas como ORSA (*S. aureus* oxacilina-resistentes). Este princípio ativo é o de eleição em infecções hospitalares. Queiroz et al. (2014), ao estudarem *Staphylococcus* sp. isolado de leite bovino e outros alimentos de origem animal, encontraram 100% das cepas sensíveis a oxacilina, ressaltando a gravidade dos resultados de resistência obtidos em nosso trabalho.

É importante salientar que 05 (05/15) cepas apresentaram perfil de resistência a VRSA (*S. aureus* vancomicina-resistentes) e a MRSA, concomitantemente. A vancomicina é uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por cepas de *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA). O desenvolvimento de resistência bacteriana está invariavelmente ligado ao uso terapêutico dos agentes microbianos. Um conceito importante que deve ficar claro é que o antimicrobiano não induz a resistência e sim seleciona as bactérias mais resistentes existentes no meio de uma população (ALTERTHUM, 2005).

Com relação à formação de biofilme todas as amostras formaram biofilmes nas diferentes temperaturas e em diferentes graus de aderência. Apenas uma amostra oriunda do tanque após a detergentização (TqD2) não formou biofilme a 3°C, mas formou nas demais temperaturas. A importância da formação de biofilme a 3°C está no fato de que segundo a IN 62 (BRASIL, 2011), em se tratando de tanque de refrigeração por expansão direta, a temperatura para armazenamento do leite deve ser igual ou inferior a 4°C no tempo máximo de 3h após o término da ordenha. No entanto, verificou-se que também à formação de biofilmes nesta temperatura.

Uma característica importante dos *S. aureus* é a sua capacidade de formar biofilmes em superfícies biológicas e inertes. Na indústria, a formação de biofilmes é um problema pois, além das implicações em saúde pública pela disseminação de patógenos via alimentos, os biofilmes podem reduzir a vida útil de equipamentos causando perdas econômicas significativas. Somam-se a isso os problemas decorrentes do aumento da resistência bacteriana a sanitizantes, o que agrava o problema de sua ocorrência no ambiente de processamento de alimentos (OLIVEIRA et al., 2013).

Lee (2012), ao estudar a ocorrência de *S. aureus* produtores de biofilmes em ambiente de ordenha em propriedades no Estado de São Paulo, constatou que do total de isolados obtidos de leite, tanques, equipamentos e manipuladores, 41,9% foram considerados capazes de produzir biofilmes em aço inoxidável. Os autores relacionaram a alta porcentagem de cepas biofilmes positivas encontrada em tanques de expansão aos riscos de contaminação do produto, podendo os biofilmes formados constituírem um foco constante de disseminação da bactéria no leite e derivados.

Os resultados desta pesquisa apresentam grande relevância, pois existem poucos relatos de *S. aureus* resistentes a metilicina (MRSA) e a vancomicina (VRSA) isolados de alimentos ou de superfícies em contato com estes. Apesar das doenças de origem alimentar causadas por *S. aureus* estarem relacionadas com a ingestão de toxinas produzidas pelo mesmo, alimentos com a presença de microrganismos resistentes a princípios ativos de eleição para o tratamento de infecções sistêmicas é um grande risco. Consumir ou manipular leite cru ou seus derivados sem processamento térmico adequado pode resultar em infecção de seres humanos por estas cepas que sem tratamento apropriado, pode levar ao óbito.

4 CONCLUSÃO

Todas as cepas de *Staphylococcus aureus* avaliadas apresentaram perfis de multirresistência aos antimicrobianos testados, com IRMA de 0,5 a 1. Além disso, todas formaram biofilmes nas diferentes condições de temperatura. Este resultado é de grande relevância, uma vez que microrganismos altamente resistentes a antimicrobianos estão em contato com o leite que será comercializado, e podem causar enfermidades aos consumidores destes produtos e manipuladores de alimentos da propriedade leiteira.

5 AGRADECIMENTOS

A Capes/Prosup/UPF por apoiarem esse estudo através da concessão de bolsa.

6 REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antimicrobianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 79-84.
- BAUER-GARLAND, J. et al. Transmission of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* in poultry with and without antimicrobial selective pressure. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.1301-1308, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – Abril 2013. Disponível em: <http://www.camara.leg.br>. Acesso em 22 jan 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 62 de 29 de setembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite Tipo A, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e de seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília DF, 29 de dez. de 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second information supplement. M100-S22. CLSI: Wayne, PA, USA. 2012.

COSTA, G.M. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

FRYE, J. G.; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. Isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 135, p. 1-22, 2013.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 46, v. 1, 165-170, 1983.

LEE, S.H.I. Identificação molecular de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilmes em ambiente de ordenha. **Dissertação** (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo- USP, Pirassununga – SP, 2012. 71p.

MARTIN, J.G.P. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frenal. **Tese** (Doutorado). Universidade de São Paulo – USP. Piracicaba, SP. 2015. 102p.

NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS). 2012. “**Strategic Plan 2012-2016**”. Disponível em:

<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>>. Acesso em 03 maio 2014.

OLIVEIRA, M.M.M. et al. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v.68, n.390, p.67-73, 2013.

QUEIROZ, M.R.A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.16, n.3, supl. I, p.737-743, 2014.

RODRIGUES, L.B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1082-1085, 2010.

SALIMENA, A.P.S. Formação de biofilme na indústria de alimentos por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina. **CES Revista**, v. 28, n. 1. p. 88-102, jan./dez. 2014.