



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

Multirresistência antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* formadores de biofilme isolados de ambiente de ordenha

AUTOR PRINCIPAL: Edinara Silva de Lima.

CO-AUTORES: : Bohrz, D.A.S.; Aquino, N.S.M.; Gehlen, S.S.; Webber, B; Farenzena, B.C.; Silva, B.C.; Pilotto, F.; Orsato, J.; Santos, L.R.; Nascimento, V.P.

ORIENTADOR: Laura Beatriz Rodrigues.

UNIVERSIDADE: Universidade de Passo Fundo.

INTRODUÇÃO

A ocorrência do *Staphylococcus aureus* em alimentos, como o 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). A eliminação da mastite estafilocócica é uma das formas de evitar que este microrganismo chegue ao leite. Porém, o uso indiscriminado de antibióticos gera uma pressão seletiva, resultando na resistência antimicrobiana, selecionando bactérias, modificando a estrutura de comunidades bacterianas e induzindo uma evolução acelerada com consequências imprevisíveis para a saúde humana e animal (ALTERTHUM, 2005). O objetivo foi verificar a resistência a antimicrobianos, fatores de virulência e a capacidade de produção de biofilmes de *S. aureus* de leite e ambiente de ordenha de uma propriedade leiteira no Rio Grande do Sul. Apresenta grande relevância, por existir poucos relatos de MRSA e VRSA isolados de alimentos ou superfícies de contato.

DESENVOLVIMENTO:

Analisou-se 15 isolados de *S. aureus* provenientes do leite e do ambiente de ordenha, sendo 6 isolados de teteiras, 5 de água do CIP, 2 do tanque de refrigeração, 2 do leite do conjunto; e a cepa *S. aureus* ATCC 25923. Realizou-se a resistência aos antimicrobianos pela técnica de disco-difusão (CLSI, 2012). Utilizou-se o critério para multirresistência aos fármacos segundo Narms (2012) e o índice de resistência múltipla antimicrobiana (IRMA) foi calculado conforme Krumperman (1983). Testes para produção de cápsula, hemolisina e protease foram segundo as metodologias descritas por Freeman et al., (1989), Dias et al., (1994) e Budi et al., (2000), respectivamente. O método para detecção da formação de biofilme em superfície de poliestireno foi baseado em Rodrigues et al., (2010), classificando as amostras quanto ao grau de aderência. Os resultados obtidos demonstraram que o IRMA dos *S. aureus* variou de 0,5 a 1,0 (Tabela 1). Segundo com Krumperman (1983), $IRMA \geq 0,2$ caracteriza o fenômeno da múltipla resistência, indicando um risco para saúde pública, pois o tratamento de enfermidades de animais e humanos fica dificultado. O debate sobre a elevada resistência microbiana observada na medicina humana e, particularmente, de linhagens meticilina-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, característica de MRSA e 33,34% (05) à VRSA (*S. aureus* vancomicina-resistentes) e a MRSA, concomitantemente. A vancomicina é uma das poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA/MRSA). Ressalta-se que o antimicrobiano não induz a resistência e sim seleciona as bactérias mais resistentes existentes em uma população (ALTERTHUM, 2005), propagando-as no meio e em indivíduos infectados. Com relação à capacidade de adesão, todas formaram biofilmes em diferentes temperaturas e graus de aderência (Tabela 2). De acordo com IN 62 (BRASIL, 2011), a temperatura para armazenamento do leite no tanque de refrigeração por expansão direta deve ser \leq a 4°C. No entanto, verificou-se que também há formação de biofilmes por *S. aureus* nesta faixa de temperatura. Na indústria, biofilmes são um problema pois, além da disseminação de patógenos via alimentos, os mesmos podem reduzir a vida útil de equipamentos, causando perdas econômicas significativas. Sobre os fatores de virulência (Tabela 2), 13 isolados (86,7%) formaram cápsula, 9 (60%) demonstraram presença de protease, 4 (26,7%) expressaram o fator α -hemolisina e 2 (13,3%) β -hemolisina. Duas (13,34%) foram positivas para os três fatores de virulência analisados, e formaram biofilmes fortemente aderentes nas temperaturas de 36°C e

42°C. Ressalta-se que identificamos MRSA e VRSA de grande risco, que pode infectar seres humanos durante o consumo ou manipulação de leite cru ou derivados e, sem antibioticoterapia apropriada, pode levar ao óbito.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Todas as cepas de *S. aureus* foram multirresistentes, com IRMA de 0,5 a 1,0. Formaram biofilmes nas diferentes condições de temperatura, e apresentaram fatores de virulência. 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.

REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- BRASIL. MAPA. IN nº 62. **Diário Oficial**. 29 de dezembro de 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). M100-S22. USA. 2012.
- NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS). 2012. **“Strategic Plan 2012-2016”**.
- KRUMPERMAN, P. H. **Applied and Environmental Microbiology**, 1983.
- BUDI, S.W. et al. **Applied Soil Ecology**, 2000.
- DIAS, A.M.G. et al. **Revista de Microbiologia**, 1994.
- FREEMAN, D.J. et al. **J Clin Pathol.**, 1989.
- MARTIN, J.G.P. Biofilmes de *Staphylococcus aureus* isolados de laticínios produtores de queijo Minas frescal. **Tese – USP**. 2015. 102p.
- RODRIGUES, L.B. et al. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010.

NÚMERO DA APROVAÇÃO CEP OU CEUA (para trabalhos de pesquisa): Não foi necessário, visto que não se utilizou o modelo animal.

ANEXOS

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= Sulfa + Trimetropim 25 µg, Ctf= Ceftiofur 30µg.

Tabela 2- Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* isoladas de diferentes pontos em sala de ordenha mecanizada.

| Identificação da amostra | Origem | Aderência a 550 nm | | | | | Fatores de virulência | | | Perfil de resistência antimicrobiana |
|--------------------------|--------|--------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|----------|------------|--------------------------------------|
| | | 3°C | 9°C | 25°C | 36°C | 42°C | Cápsula | Protease | Hemolisina | |
| ST1 | TetO1 | FRACA | FRACA | MODERADA | FRACA | MODERADA | + | + | - | P6 |
| ST2 | CipO1 | MODERADA | FRACA | MODERADA | FORTE | FORTE | + | + | +β | P11 |
| ST3 | LO1 | FRACA | MODERADA | MODERADA | FORTE | FORTE | + | - | +α | P4 |
| ST4 | TetD1 | FRACA | FRACA | MODERADA | FRACA | FRACA | + | + | - | P1 |
| ST5 | TetS1 | FRACA | FORTE | FRACA | FORTE | FORTE | + | + | +β | P8 |
| ST6 | CipS1 | FRACA | FRACA | FRACA | FORTE | FORTE | + | - | +α | P1 |
| ST7 | TetAO2 | FRACA | MODERADA | MODERADA | FORTE | FORTE | + | + | - | P3 |
| ST8 | CipAO2 | FRACA | FRACA | FORTE | FORTE | FORTE | + | - | +α | P7 |
| ST9 | TetO2 | FRACA | FRACA | MODERADA | FRACA | MODERADA | + | + | - | P7 |
| ST10 | CipO2 | FRACA | FRACA | FRACA | FORTE | FORTE | + | - | +α | P9 |
| ST11 | LO2 | FRACA | FRACA | FRACA | MODERADA | MODERADA | + | + | - | P2 |
| ST12 | TqO2 | FRACA | FRACA | FRACA | MODERADA | MODERADA | + | + | - | P5 |
| ST13 | TqD2 | NÃO ADERENTE | FRACA | MODERADA | MODERADA | FORTE | - | - | - | P10 |
| ST14 | TetAS2 | MODERADA | MODERADA | FORTE | FORTE | FORTE | - | - | - | P7 |

TetO1: teteiras com resíduos de leite da ordenha 1; **CipO1:** água do primeiro enxágue do processo Clean-in-Place (CIP), após a ordenha 1; **LO1:** leite do conjunto da ordenha 1; **TetD1:** teteiras, imediatamente após a detergentização da ordenha 1; **TetS1:** teteiras, após o sanitizante e imediatamente depois da detergentização da ordenha 1; **CipS1:** água do CIP após o sanitizante, imediatamente depois da detergentização da ordenha 1; **TetAO2:** teteiras após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas, antes da ordenha 2; **CipAO2:** água do enxágue da tubulação do CIP, após o sanitizante 1, sem uso por 8 horas; **TetO2:** teteiras com resíduos de leite da ordenha 2; **CipO 2:** água do primeiro enxágue do processo CIP, após a ordenha 2; **LO2:** leite do conjunto da ordenha 2; **TqO2:** tanque com resíduos após a retirada do leite do conjunto da ordenha 2; **TqD2:** tanque após a detergentização, na ordenha 2; **TetAS2:** teteiras após a detergentização 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha; **CipAS2:** água do CIP após a detergentização 2, sem uso por 8 horas, antes do sanitizante 2 e da próxima ordenha.

Não aderente: DOa ≤ DO; **Fracamente aderente:** DO < DOa ≤ 2.DO; **Moderadamente aderente:** 2.DO < DOa ≤ 4.DO; **Fortemente aderente:** 4.DO < DOa.