

27 A 29 DE OUTUBRO DE 2020



ON LINE

7º Simpósio de  
Segurança Alimentar

Inovação com sustentabilidade

## ISOLAMENTO E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE COCOS GRAM-POSITIVOS ISOLADOS DE LEITE PASTEURIZADO

M. A. A. Machado<sup>1</sup>, W. A. Ribeiro<sup>1</sup>, V. S. Toledo<sup>1</sup>, G. L. P. A. Ramos<sup>2</sup>, J. S. Nascimento<sup>1</sup>

1- Departamento de Alimentos - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – CEP: 20270-021 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil, Telefone 55 (21)2566-7792 – e-mail: ([janaina.nascimento@ifrj.edu.br](mailto:janaina.nascimento@ifrj.edu.br)).

2 - Departamento de Bromatologia - Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Farmácia – CEP: 24241-001- Niterói - RJ – Brasil, Telefone 55 (21) 2629-9601 – e-mail: ([gustavoanciens@gmail.com](mailto:gustavoanciens@gmail.com)).

**RESUMO** – O leite se revela como reservatório de diversos grupos de microrganismos, que podem oferecer riscos à saúde humana e contribuir com a disseminação de genes de resistência. Neste trabalho, foi verificado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de cocos Gram-positivos catalase-positivos isoladas de amostras de leite pasteurizado provenientes da cidade do Rio de Janeiro. Trinta e três isolados, a partir de ágar Baird- Parker, puderam ser identificados por espectrometria de massas, sendo 48% como *Kocuria varians*, 42% como *Micrococcus caseolyticus* e 9% como *Staphylococcus epidermidis*. O perfil de susceptibilidade a antibióticos revelou que 22 isolados foram resistentes a pelo menos 1 antibiótico. Quatro isolados de *K. varians* foram considerados multirresistentes (MDR). Embora *M. caseolyticus* e *K. varians* não sejam considerados patógenos associados a alimentos, a presença de isolados resistentes alerta para o perigo de transmissão de genes de resistência à outras bactérias, em especial, à *Staphylococcus* sp..

**ABSTRACT** - Milk is revealed as a reservoir for several groups of microorganisms, which can pose risks to human health and contribute to the spread of resistance genes. In this work, the susceptibility profile to antimicrobials of catalase-positive Gram-positive cocci isolated from samples of pasteurized milk from the city of Rio de Janeiro was verified. Thirty-three isolates, from Baird-Parker agar, could be identified by mass spectrometry, 48% as *Kocuria varians*, 42% as *Micrococcus caseolyticus* and 9% as *Staphylococcus epidermidis*. The antibiotic susceptibility profile revealed that 22 isolates were resistant to at least 1 antibiotic. Four isolates of *K. varians* were considered multidrug-resistant (MDR). Although *M. caseolyticus* and *K. varians* are not considered pathogens associated with food, the presence of resistant isolates warns of the danger of transmitting resistance genes to other bacteria, especially *Staphylococcus* sp..

**PALAVRAS-CHAVE:** cocos Gram-positivos catalase positiva, leite pasteurizado, resistência a antibióticos, *Kocuria*, *Micrococcus*.

**KEYWORDS:** Gram-positive catalase-positive cocci, pasteurized milk, antibiotic resistance, , *Kocuria*, *Micrococcus*.

### 1. INTRODUÇÃO

O leite constitui um habitat para uma grande variedade de micro-organismos provenientes de diversas origens, como do ordenhador ou de utensílios e equipamentos utilizados na ordenha, no

REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO



[www.officeeventos.com.br](http://www.officeeventos.com.br)



transporte ou no armazenamento do leite, da pele ou das fezes dos animais, do ambiente e, até mesmo, de dentro do úbere, como nos casos de mastite (Ali et al., 2017).

No tratamento da mastite, vários antibióticos podem ser utilizados, porém, sabe-se que o uso excessivo ou inadequado desses medicamentos pode levar à aquisição de resistência por bactérias. *Staphylococcus* sp. constituem um dos principais micro-organismos associados à mastite e são frequentemente encontrados no leite. No entanto, outros gêneros de cocos Gram-positivos catalase-positivos relacionados a *Staphylococcus* sp., como *Kocuria* e *Macrococcus*, também são encontrados neste alimento (Martinez et al., 2017; Ribeiro-Júnior et al., 2018) e podem transferir genes de resistência tanto entre si como para outras bactérias (MacFadyen et al., 2018).

Embora a pasteurização surja como um dos processos térmicos mais comuns utilizados para reduzir a presença de micro-organismos patogênicos no leite, sabe-se que essa técnica não é capaz de eliminar toda sua população (Knight et al., 2004; Ribeiro-Júnior et al., 2018). Este trabalho teve por objetivo detectar a presença e avaliar a susceptibilidade a antibióticos de isolados de *Staphylococcus* sp. e de outros cocos Gram-positivos catalase-positivos provenientes de amostras de leite pasteurizado comercializado na Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras utilizadas

Uma vez que o leite é um dos principais alimentos associados à presença de *Staphylococcus* sp., nove amostras oriundas de duas marcas diferentes de leite pasteurizado comercializado na cidade do Rio de Janeiro foram selecionadas como a matriz alimentar utilizada para o isolamento inicial de *Staphylococcus*, mas também visando detectar outros possíveis cocos Gram-positivos catalase-positivos. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais locais da Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro e conduzidas ao laboratório de Microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), sob refrigeração, para as análises microbiológicas.

### 2.2 Isolamento de *Staphylococcus* sp. e de demais cocos Gram-positivos

O isolamento foi realizado seguindo-se a metodologia para *Staphylococcus* coagulase-positiva em alimentos, conforme IN 62 de 2003 (BRASIL, 2003), uma vez que não existe procedimento específico para o isolamento de outros cocos Gram-positivos em alimentos.

Vinte e cinco gramas de leite foram diluídos em 225 mL de água peptonada a 0,1%, homogeneizadas por 60 segundos e diluídas até a diluição  $10^{-3}$ . Alíquotas das diluições foram plaqueadas em ágar Baird-Parker e as placas incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram selecionadas colônias típicas (circulares, pretas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca) e atípicas (colônias morfologicamente semelhantes às típicas, porém, sem a presença de halos).

### 2.3 Identificação dos isolados

A identificação dos isolados foi realizada em espectrômetro de massas MALDI-TOF (Microflex LT, Bruker, Estados Unidos), no Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

## 2.4 Determinação do perfil de susceptibilidade a antibióticos

A técnica de difusão em disco foi utilizada para avaliar a perfil de susceptibilidade a antimicrobiana *in vitro* dos isolados, acordo com as especificações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). A estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle nos testes de antibiograma. Com base nos padrões previamente definidos pelo CLSI, os isolados foram classificados como suscetíveis, moderadamente suscetíveis (resistência intermediária) ou resistentes aos antibióticos testados (CLSI, 2018). Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10 µg), penicilina (10 µg) e tetraciclina (30 µg), o que compreende representantes das seguintes classes de antibióticos: fluoroquinolonas, lincosaminas, fencóis, macrolídeos, aminoglicosídeos, penicilinas e tetraciclina.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Zona Norte da cidade do Rio de Janeiro, não é tão comum encontrar leite pasteurizado sendo comercializado, pois poucos estabelecimentos, em geral aqueles que possuem um público mais fiel a esse tipo de alimento, dispõem do produto. Nove amostras de leite foram analisadas neste trabalho, e destas, cinco apresentaram contagens inferiores a  $10^2$  UFC/ml de colônias típicas (colônias negras, circulares, pequenas com halo transparente) e atípicas (colônias negras, circulares, sem a presença de halo transparente), sugestivas de *Staphylococcus* sp.. As demais apresentaram contagens que variaram entre  $4,2 \times 10^3$  e  $1,0 \times 10^5$  UFC/ml, conforme apresentado na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Quantificação das colônias sugestivas de *Staphylococcus* sp. nas amostras de leite utilizadas neste trabalho.

Amostra	Contagem de colônias típicas e atípicas sugestivas de <i>Staphylococcus</i> sp. (UFC/ml)
L1	$1,0 \times 10^5$
L2	$< 10^2$
L3	$< 10^2$
L4	$6,6 \times 10^4$
L5	$9,1 \times 10^4$
L6	$4,2 \times 10^3$
L7	$< 10^2$
L8	$< 10^2$
L9	$< 10^2$

Foram selecionados 64 isolados. No entanto, após serem submetidos à espectrometria de massa por MALDI-TOF, 31 (48,4%) deles não apresentaram uma identificação confiável ao nível de gênero, sendo, então, descartados. Os demais foram identificados como *Staphylococcus epidermidis* (n=3; 4,7%), *Macrocooccus caseolyticus* (n=14; 21,9%) e *Kocuria varians* (n=16; 25%), todos estes sendo cocos Gram-positivos catalase-positivos. Todos os isolados de *M. caseolyticus* foram provenientes da amostra 1, enquanto os de *K. varians* e *S. epidermidis* foram obtidos da amostra 5.

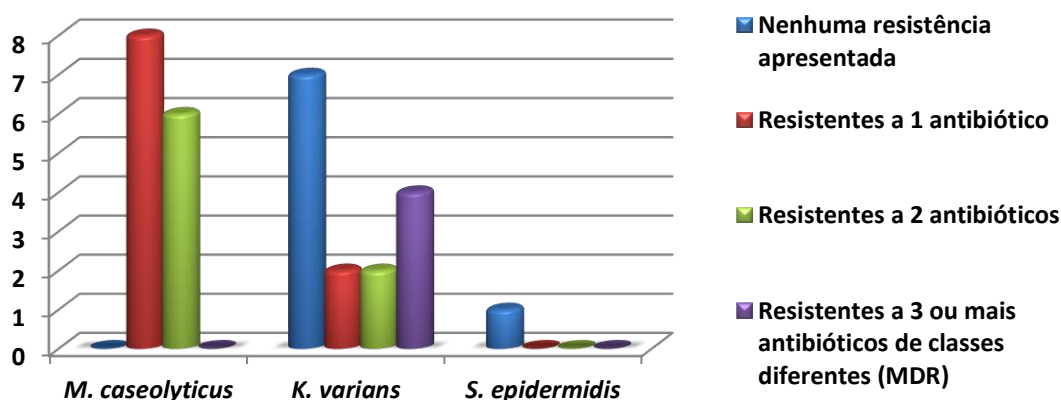
Vale ressaltar que *M. caseolyticus*, até o ano de 1988, estava incluído no gênero *Staphylococcus* como *S. caseolyticus* (Kloos et al., 1988). *K. varians*, por sua vez, era conhecido como *Micrococcus varians*, mas foi incluído nesse novo gênero em 1995 (Stackebrandt et al., 1995).

Bactérias do gênero *Micrococcus*, apesar de estreitamente relacionadas ao gênero *Staphylococcus*, ao contrário desses, não são consideradas patogênicas para o homem. Entretanto, algumas espécies estão se tornando cada vez mais reconhecidas como patógenos veterinários. Alguns trabalhos relatam a detecção de *M. caseolyticus*, incluindo estirpes resistentes à meticilina, em casos de mastite bovina (MacFadyen et al., 2018) e também de amostras de leite pasteurizado (Schwendener et al., 2017).

Da mesma forma, embora não seja comum a associação a infecções, algumas espécies de *Kocuria*, como *K. kristinae* e até mesmo *K. varians*, vêm emergido como patógenos humanos oportunistas, principalmente em hospedeiros comprometidos com alguma doença subjacente grave (Purty et al., 2013; Mazhar et al., 2018). Já estudos sobre a presença de *K. varians* em alimentos são bem mais escassos, mas sabe-se que esta espécie possui potencial de atuar como cultura microbiana adjunta para contribuir com o perfil sensorial típico do queijo Tetilla, tradicional na Espanha, obtido a partir de leite cru (Centeno et al., 2017).

O antibiograma foi realizado inicialmente com 30 isolados e revelou que 22 deles foram resistentes a pelo menos 1 antibiótico. Os antibióticos que apresentaram o maior número de isolados resistentes foram a penicilina (18 isolados) e a tetraciclina (11 isolados). Clindamicina, cloranfenicol e norfloxacina tiveram, respectivamente, 5, 3 e 1 isolados resistente.

Todos os 14 isolados de *M. caseolyticus* foram resistentes a pelo menos 1 antibiótico (**Figura 1**), porém, não foram detectados isolados MDR. MacFadyen et al. (2018) descrevem que, embora geralmente comensais, estirpes de *Micrococcus* sp., podem codificar a resistência à vários antibióticos, entre eles a meticilina, e podem estar implicados na propagação dessa resistência para os estafilococos.



**Figura 1:** Perfil de susceptibilidade a antibióticos exibido pelos cocos Gram-positivos catalase-positivos isolados neste trabalho.

Dos 15 isolados de *K. varians* testados, quatro foram resistentes a pelo menos 1 antibiótico de 3 classes diferentes e foram considerados multirresistentes (MDR) (**Figura 1**). Em um dos poucos trabalhos que retratam o isolamento e a caracterização de bactérias do gênero *Kocuria* em alimentos, Rodríguez-Alonso et al. (2009) também relataram a detecção de isolados multirresistentes de *Kocuria varians* isolados de queijos artesanais produzidos com leite cru.





## 4. CONCLUSÕES

A presença de isolados de *M. caseolyticus*, *S. epidermidis* e *K. varians* resistentes a antibióticos, assim como os 4 isolados de *K. varians* com fenótipo MDR nas amostras de leite analisadas é preocupante, pois destaca o possível papel desse alimento como um reservatório de genes de resistência, o que poderia levar à sua disseminação, por mecanismos de transferência gênica, entre estafilococos patogênicos e outros grupos relacionados comumente encontrados no leite.

## 5. REFERÊNCIAS

- Ali, N. M., Sarwar, K., Mazhar, S. A., Liaqat, I., Andleeb, S., Mazhar, B., & Kalim, B. (2017). Effect of medicinal plants, heavy metals and antibiotics against pathogenic bacteria isolated from raw, boiled and pasteurized milk. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(6), 2173-2182.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2003). *Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água* (Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.
- Centeno, J. A., Garabal, J. I., Docampo, F., Lorenzo, J. M., & Carballo, J. (2017). Recovering traditional raw-milk Tetilla cheese flavour and sensory attributes by using *Kocuria varians* and *Yarrowia lipolytica* adjunct cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 33-40.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA.
- Kloos, W. E., Ballard, D. N., George, C. G., Webster, J. A., Hubner, R. J., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Fiedler, F., & Schubert, K. (1998). Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *International Journal of Systematics Bacteriology*, 48:859-877.
- Knight, G. C., Nicol, R. S. & McMeekin, T. A. (2004). Temperature step changes: A novel approach to control biofilms of *Streptococcus thermophilus* in a pilot plant-scale cheese-milk pasteurization plant. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 305-318.
- MacFadyen, A. C., Fisher, E. A., Costa, B., Cullen, C., & Paterson, G. K. P. (2018). Genome analysis of methicillin resistance in *Macrococcus caseolyticus* from dairy cattle in England and Wales. *Microbial Genomics* 4: 1-8.
- Martinez, B. A., Stratton, J., & Bianchini, A. (2017). Isolation and genetic identification of spore-forming bacteria associated with concentrated-milk processing in Nebraska. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 919-932.
- Mazhar, S., Hill, C., & McAuliffe, O. (2018). The Genus *Macrococcus*: An insight into its biology, evolution, and relationship with *Staphylococcus*. In: *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press. p. 1-50.
- Purty, S., Saranathan, R., Prashanth, K., Narayanan, K., Asir, J., Sheela Devi, C., & Kumar-Amarnath, S. (2013). The expanding spectrum of human infections caused by *Kocuria* species: a case report and literature review. *Emerging Microbes & Infections*, 2(10), e71.
- Ribeiro-Júnior, J., Tamanini, R., Oliveira, A. L. M., Alfieri, A. A., & Beloti, V. (2018). Genetic diversity of thermophilic spoilage microorganisms of milk from Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 101(8), 6927-6936.
- Rodríguez-Alonso, P., Fernández-Otero, C., Centeno, J. A., & Garabal, J. I. (2009). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *Journal of Food Science*, 74(6), M284-M293.



Schwendener, S., K. Cotting, & V. Perreten. (2017). Novel methicillin resistance gene *mecD* in clinical *Micrococcus caseolyticus* strains from bovine and canine sources. *Scientific Reports* 7:43797.

Stackebrandt, E., Koch, C., Gvozdiak, O., & Schumann, P. (1995). Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(4), 682-692.