



## IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE TETEIRAS DE SALA DE ORDENHA E SUSCETIBILIDADE ÀS CEFALOSPORINAS

P.R. Santos<sup>1</sup>, H.G. Lima<sup>2</sup>, N.D. Cereser<sup>3</sup>, S.L. Ladeira<sup>4</sup>, G.C. Dors<sup>5</sup>, P.S. Nascente<sup>6</sup>

1- Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia– CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS – Brasil – e-mail: ([rassier1907@gmail.com](mailto:rassier1907@gmail.com))

2- Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS - Brasil – email: ([helenicegonzalez@hotmail.com](mailto:helenicegonzalez@hotmail.com))

3 - Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS - Brasil – email: ( [natachacereser@yahoo.com.br](mailto:natachacereser@yahoo.com.br))

4 - Laboratório Regional de Diagnóstico – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS – Brasil – email: ([s.ladeira@hotmail.com](mailto:s.ladeira@hotmail.com))

5 - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS – Brasil – e-mail: ([dorsgi@yahoo.com.br](mailto:dorsgi@yahoo.com.br))

6 - Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia– CEP: 96010-900 – Capão do Leão – RS – Brasil – e-mail: ([pattsn@gmail.com](mailto:pattsn@gmail.com))

**RESUMO** – O leite é um alimento de alto valor nutricional que auxilia no desenvolvimento e crescimento humano. No entanto, também pode abrigar micro-organismos indesejáveis, potencialmente nocivos à saúde humana e que acabam influenciando de forma negativa na qualidade do produto. O objetivo deste trabalho foi identificar e avaliar o perfil de suscetibilidade de cocos gram-positivos isolados de teteiras em salas de ordenha de oito propriedades localizadas no sul do Rio Grande do Sul. A identificação foi realizada através de técnicas bioquímicas e moleculares e os micro-organismos identificados foram: *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1) e *Streptococcus dysgalactiae* (1). Quatro antibióticos da classe das Cefalosporinas foram avaliados: Cefoxitina 30 µg, Cefotaxima 30 µg, Ceftriaxona 30 µg, Cefuroxina 30 µg. Nenhum antibiótico mostrou 100% de eficácia frente aos isolados de *Enterococcus faecalis* e *faecium* e ao único isolado de *Streptococcus uberis*.

**ABSTRACT** – Milk is a high nutritional value food that plays an important role in human development and growth. However, it can also harbor unwanted microorganisms, potentially harmful to human health and that end up having a negative influence on the quality of the product. The aim of this work was to identify and evaluate the susceptibility profile of gram-positive cocci isolated from liners in milking rooms of eight properties located in the south of Rio Grande do Sul. The identification was carried out using biochemical and molecular techniques and the identified microorganisms were: *Enterococcus faecalis* (10), *Enterococcus faecium* (4), *Staphylococcus intermedius* (1), *Streptococcus uberis* (1) and *Streptococcus dysgalactiae* (1). Four cephalosporin antibiotics were evaluated: Cefoxitin 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Ceftriaxone 30 µg, Cefuroxin 30 µg. None of the antibiotic showed 100% efficacy against the isolates of *Enterococcus faecalis* and *faecium* and *Streptococcus uberis*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Enterococcus*; suscetibilidade; contaminação alimentar, resistência antimicrobiana.



**KEYWORDS:** *Enterococcus*; susceptibility; food contamination; antimicrobial resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de alto valor nutritivo, fonte de proteínas, carboidratos, gorduras e sais minerais, que auxiliam no desenvolvimento humano (BITENCOURT et al., 2000). No Brasil, a produção leiteira se destaca entre as principais atividades agropecuárias, responsável por parte da renda nacional e arrecadação tributária (IBGE, 2019). Entretanto, o Rio Grande do Sul tem apresentado alguns problemas de qualidade, como altas contagens de micro-organismos no leite, que pode indicar falta de higiene na obtenção do mesmo e, conseqüentemente, presença de bactérias no leite e ocorrência de doenças em humanos que o consumirem (REIS et al., 2017).

Quando se trata de bactérias, os cocos gram-positivos estão entre a microbiota predominante no leite cru, sendo comumente encontrados no úbere, pele dos animais e equipamentos utilizados na ordenha (MELDAU, 2005). Dentre os gêneros que predominam, incluem-se *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Staphylococcus* (LAFARGE et al., 2004; MELDAU, 2005). Quando há falta de higiene durante o manejo e descuido na temperatura de armazenamento do leite, as bactérias presentes no mesmo podem se multiplicar, causando queda na qualidade da matéria-prima (LANGONI et al., 2011). Por isso, é importante que produtores e técnicos reavaliem os procedimentos realizados na obtenção do leite, adotando boas práticas de higiene, cuidados com a sanidade do rebanho, armazenamento adequado do leite, entre outros (RIBAS et al., 2016)

Assim, as teteiras das salas de ordenha, quando mal higienizadas, podem servir como fonte de contaminação inicial e acabar comprometendo todo o processo de tubulações que levam o leite até o tanque de refrigeração. Em consequência, haverá queda na qualidade do leite estocado na propriedade e potenciais riscos à saúde humana. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar cocos gram-positivos isolados de teteiras de salas de ordenha em propriedades leiteiras e avaliar sua suscetibilidade frente a quatro antibióticos pertencentes a classe das Cefalosporinas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram obtidas da bacterioteca do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas, originárias de teteiras de ordenhadeira e previamente caracterizadas como cocos gram-positivos através do teste de gram. Estas amostras haviam sido coletadas com *swabs* estéreis, friccionados nas teteiras e semeados em placas de Petri contendo Agar Sangue.

Para este estudo foram selecionadas 17 amostras gram positivas em forma de cocos provenientes de oito propriedades leiteiras de quatro cidades localizadas no sul do Rio Grande do Sul: Pelotas (2), Capão do Leão (4), Piratini (1) e Morro Redondo (1). Após seleção, as amostras foram caracterizadas bioquimicamente no Setor de Bacteriologia do Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Medicina Veterinária, seguindo o manual de identificação bacteriana de Cowan e Steel (STELL et al., 1993). Foram submetidas ao teste de Catalase para diferenciar *Staphylococcus* spp. de *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Amostras positivas para Catalase foram submetidas a MR-VP, teste de Coagulase, verificada a resistência a polimexina e submetidas a uma bateria bioquímica com os seguintes açúcares: ribose, nitrato, galactose, maltose, manitol e trealose.

Para as amostras catalase negativa foi feito CAMP, utilizando os açúcares esculina, inulina, manitol, salicina, sorbitol e trealose. Essas amostras foram semeadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) + NaCl a 6,5% para diferenciar *Streptococcus* spp. de *Enterococcus* spp. Após a realização de cada teste, as amostras foram dispostas em estufa a 37 °C e a leitura foi realizada após 24 h. Para confirmação da identificação bioquímica, fez identificação molecular através da técnica de Reação em Cadeira de Polimerase (PCR),



utilizando os seguintes primers: F-ATCAAGTACAGTTAGTCTT e R-ACGATTCAAAGCTAACTG (*Enterococcus faecalis*); F- GCAAGGCTTCTTAGAGA e R- CATCGTGTAAGCTAACTTC (*Enterococcus faecium*); F- GAACACGTTAGGGTCGTC e R- AGTATATCTTAACTAGAAAAACTATTG (*Streptococcus dysgalactiae*); F- TAAGGAACACGTTGGTTAAG e R- TTCCAGTCCTTAGACCTTCT (*Streptococcus uberis*); F-CCGTATTAGCTAGTTGGTGG e R-GAATGATGGCAACTAAGTTC (*Staphylococcus intermedius*).

Após identificação, a suscetibilidade dos micro-organismos foi analisada frente a quatro antibióticos da classe das Cefalosporinas: Cefuroxima (CRX) 30 µg, Ceftriaxona (CRO) 30 µg, Cefotaxima (CTX) 30 µg, Cefoxitina (CFO) 30 µg através da técnica de difusão em disco (KIRBY & BAUER, 1956). Utilizaram-se também as ATCCs 25904<sup>®</sup> (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach), 12600<sup>®</sup> (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach) e 51299<sup>®</sup> (*Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer e Kilpper-Balz) como controle. Após padronizar os inóculos em aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, foram semeadas em placas de Petri contendo o meio Agar Mueller Hinton. Em seguida, com o auxílio de pinças, os discos de antibióticos foram fixados no meio, nas concentrações descritas anteriormente. Todas as placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e, após esse período, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano de cada antibiótico, seguindo o manual do CLSI (2018) para determinar se as bactérias foram suscetíveis (S), intermediárias (I) ou resistente (R) aos antibióticos testados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O gênero que predominou nas identificações foi o *Enterococcus* spp., sendo dez espécies *Enterococcus faecalis* e quatro *Enterococcus faecium*. Também foi identificado *Streptococcus uberis* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1) e *Staphylococcus intermedius* (1).

No gênero *Enterococcus* observou-se maior prevalência de *Enterococcus faecalis* como já era esperado, visto que esta espécie é a mais prevalente dentro do gênero, sendo considerada um importante patógeno ambiental relacionado a mastite bovina dentro das propriedades leiteiras (RÓŽÁŇSKA et al., 2019). As duas espécies do gênero *Enterococcus* encontradas no estudo, *E. faecalis* e *E. faecium*, causam problemas nas condições higiênico-sanitárias do leite nas propriedades, servindo como indicadores de contaminação fecal (TEBALDI et al., 2008).

Com relação ao gênero *Streptococcus*, o *S. uberis* é um patógeno importante na indústria de laticínios e também pode estar relacionado a problemas na sanidade leiteira, pois é encontrado nos animais, estrume, pasto e material de cama (DIESER et al., 2017; WARD et al., 2009). Como características clínicas, alteram o leite elevando a Contagem Bacteriana Total (CBT) nos tanques de refrigeração, sendo pouco relacionados a doenças sistêmicas (QUINN et al., 2005). O *Streptococcus dysgalactiae* também está entre os micro-organismos mais comuns relacionados a mastites ambientais, que tem como principal reservatório o ambiente que a vaca vive, não se limitando apenas a locais onde é realizada a ordenha (BOLTE et al., 2020).

A Tabela 1 mostra o perfil de suscetibilidade das bactérias frente aos antibióticos testados.

Tabela 1 – Taxa de resistência aos quatro antibioticos da classe das Cefalosporinas das ATCCs e bactérias isoladas de teteiras em propriedades leiteiras no sul do RS

| Espécie/ ATB                        | N  | Cefoxitina | Cefotaxina | Ceftriaxona | Cefuroxima |
|-------------------------------------|----|------------|------------|-------------|------------|
| <b>ATCC 25904</b>                   | 1  | 0%         | 0%         | 0%          | 0%         |
| <b>ATCC 12600</b>                   | 1  | 0%         | 0%         | 0%          | 0%         |
| <b>ATCC 51299</b>                   | 1  | 100%       | 100%       | 100%        | 100%       |
| <b><i>Enterococcus faecalis</i></b> | 10 | 100%       | 90%        | 100%        | 90%        |
| <b><i>Enterococcus faecium</i></b>  | 4  | 100%       | 75%        | 25%         | 100%       |



|                                   |   |      |      |      |      |
|-----------------------------------|---|------|------|------|------|
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | 1 | 0%   | 0%   | 0%   | 0%   |
| <i>Streptococcus uberis</i>       | 1 | 100% | 100% | 100% | 100% |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 1 | 0%   | 0%   | 0%   | 0%   |

A resistência de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* frente às Cefalosporinas já foi observada em outros trabalhos da literatura, Shepard e Gilmore (2002) descreveram a resistência intrínseca desses micro-organismos a esta classe. As bactérias deste estudo foram isoladas de revestimentos no início das tubulações que levam o leite bovino aos tanques de armazenamento, o que pode tornar-se um problema em saúde pública, uma vez que os genes de resistência bacterianos podem atingir os seres humanos através da cadeia alimentar, além de que *Enterococcus* são capazes de passar seus genes de resistência para outros micro-organismos (MADELA et al., 2017). *Streptococcus dysgalactiae* e *Staphylococcus intermedius* não apresentaram resistência aos antibióticos testados, entretanto, *Streptococcus uberis* apresentou 100% de resistência.

Os altos índices de resistência observados neste estudo podem estar relacionados ao uso de antibióticos, procedimento utilizado dentro das salas de ordenha para o tratamento da mastite bovina (SHAHEEN et al., 2016). Essa prática, quando de forma excessiva e descontrolada, acaba selecionando bactérias resistentes que podem chegar até os seres humanos através do contato com os animais, ou contato direto ou indireto com resíduos e/ou consumo de alimentos (GRACE, 2015).

As bactérias identificadas neste estudo salientam para a necessidade de cuidados higiênicos-sanitários nas propriedades leiteiras estudadas, já que, em sua maioria, são micro-organismos provenientes das fezes e do ambiente. Além disso, é importante salientar a importância de cautela na utilização de antibióticos dentro das propriedades leiteiras, para diminuir as chances de mutações e seleção de linhagens bacterianas resistentes.

#### 4. CONCLUSÕES

Os micro-organismos identificados, após isolamento das teteiras na sala de ordenha de oito propriedades leiteiras, foram: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus uberis* e *Streptococcus dysgalactiae*. Nenhum, dos quatro antibióticos da classe das Cefalosporinas testados, mostrou 100% de eficácia frente aos isolados de *Enterococcus faecalis* e *faecium* e ao único isolado de *Streptococcus uberis*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bitencourt, D., Pegoraro, L. M. C., Gomes, J. F., Vetromila, M. A. M., Ribeiro, M. E. R., & STUMPF JR, W. (2000). Sistemas de pecuária de leite: uma visão na região de clima temperado. Pelotas: Embrapa Clima Temperado.
- Bolte, J.; Zhang, Y.; Wente, N.; Krömker, V. 2020. Susceptibilidade in vitro de patógenos de mastite isolados de casos clínicos de mastite em fazendas leiteiras do norte da Alemanha. Veterinario. Sci. 7, 10.
- CLSI, 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; M100. 38 Approved Standard —28th Edition.
- Dieser, S. A., Fessia, A. S., Ferrari, M. P., Raspanti, C. G., & Odierno, L. M. (2017). *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. Revista Argentina de Microbiología, 49(4), 305-310.



Grace, D. (2015). Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries.

IBGE, (2019). IBGE Indicadores. estatística da produção pecuária. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.

Kirby, W.M., Yoshihara, G.M, Studsted, K.S, Warren, J.H, 1956. Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics annual*.

Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., & Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5644-5650.

Langoni, H., Penachio, D. D. S., Citadella, J. C., Laurino, F., Faccioli-martins, P. Y., Lucheis, S. B., ... & Silva, A. V. D. (2011). Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(12), 1059-1065.

Madela, N. K., Silva, S. Q., Nogueira, M. C. L., & Colombo, T. E. (2017). Isolamento, identificação e detecção de resistência aos antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de carnes bovinas e suínas.

Meldau, D.C. (2005) A microbiota do leite de vaca. In: JAY, James M. (Org.). *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed.

Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J., & Leonard, F. C. (2005). *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed Editora.

Reis, E. M. B., Vieira, J. A., Demeu, M. A. L. F. A., & Bruhn, F. R. P. (2017). Identificação de pontos fracos e fortes associados à qualidade do leite em propriedade leiteiras de agricultura familiar. *PUBVET*, 11, 840-946.

Steel, K.J., Barrow, G.I., Feltham, R.K.A., 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*. Cambridge university press.

Shaheen, M., Tantary, H. A., & Nabi, S. U. (2016). A treatise on bovine mastitis: disease and disease economics, etiological basis, risk factors, impact on human health, therapeutic management, prevention and control strategy. *Advances in Dairy Research*, 1-10.

Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection*, 4(2), 215-224.

Ribas, N. P., Horst, J. A., de Andrade, U. V. C., Regonato, A., Pacheco, H. A., & Sermann, K. C. (2016). Contagem bacteriana total em amostras de leite de tanque no estado do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, 21(1).

Rózańska, H., Lewtak-Piłat, A., Kubajka, M., & Weiner, M. (2019). Occurrence of enterococci in mastitic cow's milk and their antimicrobial resistance. *Journal of veterinary research*, 63(1), 93-97.

Tebaldi, V. M. R., Oliveira, T. L. C. D., Boari, C. A., & Piccoli, R. H. (2008). Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Food Science and Technology*, 28(3), 753-760.

Ward, P. N., Holden, M. T., Leigh, J. A., Lennard, N., Bignell, A., Barron, A., ... & Egan, S. A. (2009). Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. *BMC genomics*, 10(1), 1-17.