

Identificação de espécies de *Staphylococcus* isolados de laticínios, pesquisa de genes de hemolisina e resistência a antibióticos.

Júlia Hellmeister Trevilin^{1*}, Carmen J. Contreras-Castillo², Nathália Cristina Cirone Silva³, Marjory Xavier Rodrigues⁴, Ernani Porto⁵

1. Estudante de IC da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP; *julia.trevilin@usp.br
2. Professora do Depto.de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, LAN/ESALQ/USP, Piracicaba/SP
3. Pesquisador
4. Estudante de Doutorado da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ/USP
5. *In Memoriam*

Palavras Chave: *S. aureus*, oxacilina, leite.

Introdução

As bactérias do gênero *Staphylococcus* fazem parte da microbiota de animais de sangue quente e humanos, e algumas cepas são capazes de produzir e secretar enzimas e toxinas que as tornam patogênicas. *S. aureus* é conhecida como uma das espécies mais comuns causadora de mastite bovina e é de grande importância como agente de toxinfecções alimentares (LAHOUASSA et al., 2007). As hemolisinas são citotoxinas capazes de degradar os tecidos do hospedeiro, possibilitando a invasão e a disseminação do micro-organismo (CHIH-WEI et al., 2011). Os estafilococos podem apresentar resistência a certos antibióticos, que pode ser transferida aos descendentes por mutações ou aquisições de genes (SILVA et al., 2013). Com isso, os objetivos do trabalho foram identificar 50 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de 3 laticínios e de vacas com mastite subclínica de 3 fazendas no estado de São Paulo, pertencentes ao banco de dados do laboratório de higiene e laticínios da ESALQ; pesquisar genes codificadores de hemolisinas α , β , δ , γ , γ -v nos isolados e avaliar o perfil fenotípico de resistência a antibióticos.

Resultados e Discussão

A partir dos resultados observados por PCR convencional e sequenciamento com posterior comparação pelo BLAST, foram identificados os 50 isolados. A maior parte foi identificada como *S. aureus* (72%), seguido de *S. hyicus* (14%), *S. epidermidis* (4%), *S. xylosus* (4%), *S. warneri* (4%) e *S. chromogenes* (2%), o qual já era esperado devido ao *S. aureus* ser o principal agente etiológico da mastite bovina contagiosa (LAHOUASSA et al., 2007). Em relação às hemolisinas, foram identificados os genes que codificam para β hemolisina (22% das cepas), para a γ -variante (20%), para a γ hemolisina (14%), para α e δ hemolisina (10%), e 76% das cepas foram negativas para todos os genes estudados. Dentre as cepas que foram positivas para a presença de algum dos genes de hemolisina, a maioria eram cepas provenientes de leite cru. Os antibióticos estudados foram: oxacilina, cefoxitina, vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, penicilina, tetraciclina, tobramicina. A análise feita por antibiograma resultou em 12 cepas (24,0%) sensíveis a todos os antibióticos, enquanto 38 cepas (76,0%) apresentaram resistência total ou intermediária a pelo menos um deles, sendo que 15 dessas 38 (39,5%) foram

resistentes a dois ou mais antibióticos. Dentre os antibióticos estudados, a Penicilina foi a menos eficiente (64% de linhagens resistentes), o que já era esperado pois essa droga está disponível para uso desde 1941. Os resultados para Oxacilina e Cefoxitina (16% e 22%, respectivamente) são preocupantes, pois geralmente linhagens resistentes a esses antibióticos são também resistentes à Metilina (LOWY, 1998), antibiótico muito utilizado para tratamento em humanos. Os mais eficientes foram Cloranfenicol, com 98% de linhagens sensíveis, e os Ciprofloxacina, Gentamicina, Vancomicina com 94% de linhagens sensíveis cada, porém, o Cloranfenicol e a Vancomicina apresentaram uma porcentagem, mesmo que pequena, de linhagens resistentes, o que é preocupante pois eles são antibióticos de eleição para tratamentos de humanos, tendo uso proibido para animais de produção (BRASIL, 2003).

Conclusões

A maior parte das cepas pertence à espécie *S. aureus* e a proporção de cepas com genes para hemolisina foi baixa, sendo os isolados provenientes de leite cru os que mais apresentaram estes genes. Em relação aos antibióticos, observa-se a necessidade de um cuidado em relação ao seu uso adequado, a fim de evitar a seleção de cepas resistentes.

Agradecimentos

Ao CNPq/RUSP pela concessão da bolsa durante a pesquisa.

[CLSI] Clinical Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth Informational Supplement. M100-S19. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de jun. de 2003. Dispõe sobre a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos: cloranfenicol e nitrofuranos. **Diário Oficial da União** nº123, 30 de jun. de 2003, Seção 1, p. 4.

CHIH-WEI L.; YIU-KAY L.; YU-TSUENG L.; GALLO, R.L.; CHUN-MING, H. *Staphylococcus aureus* Hijacks a skin commensal to intensify its virulence: immunization targeting β -hemolysin and camp factor. **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 131, n. 2, p. 401-409. 2011.

LAHOUASSA, H.; MOUSSAY, E.; RAINARD, P. Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Cytokine**, v.38, p.12-21.2007.

LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **N Engl J Med**. v.32, p. 339:520. 1998

SILVA, N. C. C.; GUIMARÃES, F. F.; MANZI, M. P.; BUDRI, P. E.; GÓMEZ-SANZ, E.; BENITO, D.; LANGONI, H.; RALL, V. L. M.; TORRES, C. Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, n.11, p.6856-6862, nov.2013.