

## FREQUÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococcus* spp ISOLADOS DE LEITE DE VACAS COM MASTITES RECORRENTES DE REBANHOS DA REGIÃO DE UBERLÂNDIA – MG

Cristiane Diniz Matoso Santos<sup>1</sup>, Geraldo Sadoyama Lea<sup>2</sup>, Daise Aparecida Rossi<sup>3</sup>

### RESUMO

Foram colhidas 50 amostras de leite, provenientes de vacas com mastites clínica ou subclínica recorrentes em propriedades rurais da região de Uberlândia-MG, para verificar a presença de *Staphylococcus* spp e sua susceptibilidade aos antimicrobianos. A incidência foi de 60%, pois foram isolados 30 *Staphylococcus* spp em 50 amostras avaliadas. O estudo de susceptibilidade a antimicrobianos demonstrou que 90% (27/30) das cepas eram resistentes à penicilina e ampicilina, 26,6% (8/30) à eritromicina, 16,6% (5/30) à rifampicina, 6,6% (2/30) à tetraciclina, cloranfenicol e oxacilina e 3,3% (1/30) para ciprofloxacina, clindamicina e a cefalotina. Dois espécimes de *Staphylococcus* coagulase positiva foram resistentes à oxacilina com concentração mínima inibitória (CMI) de 512mg/mL e 1028 mg/mL, respectivamente. Os resultados demonstraram a incidência do *Staphylococcus* spp como agente etiológico e evidenciaram uma elevada porcentagem de cepas resistentes, reforçando a importância do uso adequado e monitorado de antibióticos, já que cepas resistentes podem ser disseminadas no ambiente e se transformarem em sério problema de saúde pública.

**Palavras-chave:** Mastite bovina, *Staphylococcus* spp, resistência, antimicrobianos.

### INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença cosmopolita, de grande importância econômica, causada por uma

ampla gama de microrganismos, principalmente bactérias, que afetam as fêmeas de formas clínica ou subclínica (HIRSH; ZEE, 2003 e FREITAS et al., 1995). A doença permanece sendo a infecção de maior impacto econômico nos rebanhos bovinos leiteiros e a mais difícil de ser controlada (DETILLEUX, 2002; PYORALA, 2002 e PRESTES et al., 2003). Estimativas feitas em vários países indicam perdas na ordem de 10% a 15% da produção devido à doença, sendo a redução na produção total representada principalmente pela forma subclínica, pois sua prevalência é maior que a da forma clínica. Conforme Fonseca; Santos (2000) os prejuízos com a mastite no Brasil atribuídos às formas clínica e subclínica da doença representam diminuição na produção de 30% e 70%, respectivamente.

A prevalência da doença no Brasil é variável quanto à distribuição e época de análise. Langeegger et al. (1970) encontraram índice de 20% no Rio de Janeiro; Fonseca (1992) observou 38% de positividade em rebanhos produtores de leite tipo B em São Paulo e nos estados de Minas Gerais e São Paulo, a prevalência foi de 71% em estudo realizado por Costa et al. (1999).

O uso indiscriminado de antibióticos, sem a identificação do agente etiológico, pode favorecer o aparecimento de bactérias multirresistentes. *Staphylococcus aureus* isolados em ambiente hospitalar humano tem mostrado perfil de multiresistência (LEE, 2003) e cerca de 50% dos *Staphylococcus aureus* isolados por Sadoyama; Gontijo Filho (2000) apresentaram resistência a oxacilina, confirmada pela concentração mínima inibitória (CMI). Martins (1999) associa o agravamento da resistência bacteriana em ambientes hospitalares ao uso freqüente e indiscriminado de antibióticos

<sup>1</sup> Mestre em Ciências Veterinárias – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (FAMEV/UFU). cristiane.matoso@dagranja.com.br

<sup>2</sup> Professor, Doutor, Centro Universitário do Cerrado – Patrocínio (UNICERP). gsadoyama@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Professora, Doutora, FAMEV/UFU. daiser@umuarara.ufu.br

e aos mecanismos de transferência de resistência entre os microrganismos. Estes fatos são comumente observados no campo em surtos de mastite bovina (BRITO et al., 2001). As infecções por bactérias multiresistentes em humanos geralmente são mais graves, aumentando os custos do tratamento, quando comparadas às causadas por bactérias susceptíveis (AMYES; GEMMEL, 1997). Apesar dos poucos estudos, estas características são provavelmente observadas nos animais.

A maioria das amostras de estafilococos tem se tornado resistente a múltiplos antibióticos, incluindo beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, mupirocina e outros (CHAMBERS, 1997). A resistência dos *Staphylococcus* spp a oxacilina está relacionada à presença do gene *mecA*, que torna os microrganismos intrinsecamente resistentes também a outras drogas (SAHM, 1994). Espécimes de *Staphylococcus aureus* isolados de leite mastítico bovino também apresentam características de resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença (FREITAS et al., 1995).

Considerando a importância do leite na economia, alimentação humana e a possibilidade de veiculação de *Staphylococcus* spp multiresistentes através do mesmo, este trabalho tem por objetivos: verificar a frequência de *Staphylococcus* spp como agente etiológico de mastites recorrentes em propriedades rurais de Uberlândia-MG e o perfil de suscetibilidade dos isolados a diferentes antibióticos, inclusive a oxacilina.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de leite mastítico utilizadas para isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp foram selecionadas pelo teste de Califórnia Mastitis Test – CMT (mastite subclínica) e pela observação dos sinais clínicos da inflamação (mastite clínica). Os testes foram realizados em 100 vacas leiteiras de propriedades rurais da região de Uberlândia-MG no período de novembro de 2003 a abril de 2004. As informações sobre a recorrência da doença nas propriedades foram obtidas junto ao Laboratório de Doenças Infecto-contagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Foram considerados animais com mastite recorrente, àqueles que apresentaram a doença em duas ou mais lactações consecutivas, independente do isolamento do agente etiológico ou de uso de terapêutica.

As amostras que apresentaram resultados positivos para mastites clínica ou subclínica foram

colhidas em tubo de ensaio estéril, após cuidadosa anti-sepsia do teto e imediatamente transportadas ao laboratório, onde foram analisadas. O mesmo procedimento foi adotado com o leite de animais que apresentaram mastite clínica.

Para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp, o leite foi semeado na superfície de placas de Petri contendo ágar seletivo manitol salgado (MS) e as placas incubadas a 37°C por 24 a 48 horas (KONEMAN et al., 1997). Após incubação, as colônias tiveram suas características anotadas e foram cultivadas em ágar nutriente (NA) por 24 horas a 37°C, para posterior identificação pela coloração diferencial de Gram (TORTORA et al., 2002) e produção de catalase (SILVA et al., 2001). Foram considerados como *Staphylococcus* spp, os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos agrupados em cachos e catalase positiva. Esses microrganismos foram diferenciados em *Staphylococcus* coagulase positiva ou negativa por meio do teste da coagulase em tubo (SILVA et al., 2001).

Foi verificada a suscetibilidade aos antimicrobianos de todos os *Staphylococcus* spp isolados. A técnica utilizada foi a de difusão em discos em ágar Mueller-Hinton (NCCLS, 2000a). Sendo testados os seguintes antimicrobianos e concentrações: oxacilina (1mg), ampicilina (10mg), cefalotina (30mg), clindamicina (2mg), cloranfenicol (30mg), eritromicina (15mg), ciprofloxacina (5mg), penicilina G (10U), rifampicina (5mg) e tetraciclina (30mg). A amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controle.

Em paralelo à prova de difusão em discos, os estafilococos foram testados quanto à resistência a oxacilina utilizando o método de inoculação em ágar de triagem. O preparo do ágar de triagem consistiu no uso do ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6mg/mL de oxacilina, sendo o crescimento de uma única colônia indicativo de resistência (NCCLS, 2000b).

Nos espécimes identificados como resistentes a oxacilina nos métodos de difusão em ágar ou ágar de triagem foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI). Para isso foi inoculou-se com o auxílio de inoculador tipo Steers, um volume de 5mL ( $5 \times 10^6$  UFC/mL) da suspensão bacteriana (turvação 0,5 na escala MacFarland) em ágar Mueller Hinton, adicionados de oxacilina nas concentrações de: 0,25mg/mL, 0,5mg/mL, 1,0mg/mL, 2,0mg/mL, 4,0mg/mL, 8,0mg/mL, 16mg/mL, 32,0mg/mL, 64,0mg/mL, 128mg/mL, 256,0mg/mL, 512mg/mL e 1024mg/mL (NCCLS, 2000a).

A análise dos resultados foi realizada de

forma descritiva. Os valores absolutos foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados às informações disponíveis na literatura. Para verificar diferenças entre as cepas *Staphylococcus* coagulases positiva e negativa na resistência aos antibióticos avaliados, aplicou-se o teste de Mann-Whitney a 5% de significância (SAMPAIO, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 animais examinados, 50 apresentaram resultado positivo para mastites clínica ou subclínica. Destes, 44% (44/100) mostraram-se positivos no teste do CMT caracterizando mastite subclínica e em 6% (6/100) dos animais foram observados os sinais clínicos da inflamação caracterizando mastite clínica. A alta frequência (44%) de mastite subclínica observada nos animais que compõem o presente estudo também foi constatada por outros autores (FONSECA; SANTOS, 2000 e SPINOSA et al., 2000).

Após o cultivo das 44 amostras de mastite subclínica e seis de mastite clínica, trinta das 50 amostras (60%) foram confirmadas como *Staphylococcus* spp por apresentarem características típicas do gênero (TORTORA et al., 2002). A confirmação deste gênero como o principal agente etiológico das mastites concorda com outros autores (BRITO et al., 2002; RABELLO, 2003 e CUNHA et al., 2006).

Das 30 amostras identificadas como *Staphylococcus* spp, 20 (66,6%) foram classificadas como coagulase positiva, todas provenientes de mastite subclínica. A constatação desse gênero como o mais prevalente em mastites subclínicas concorda com os relatos de Brito et al. (2001); Brito et al. (2002) e Rabello (2003). Dez cepas (33,3%) foram classificadas como coagulase negativa, e destas, quatro foram isoladas de mastite subclínica e seis de mastite clínica.

Nos seis casos de mastite clínica estudados foram isolados *Staphylococcus* coagulase negativa, o que está de acordo com Waage et al. (1999) e Cunha et al. (2006), que afirmam que os *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) são os agentes mais prevalentes em mastites clínicas.

Seis das 14 amostras de mastite subclínica não classificadas como *Staphylococcus* spp, foram identificadas como *Streptococcus* spp por apresentarem morfologia de cocos Gram positivos dispostos em cadeia e catalase negativa (HIRSH; ZEE, 2003).

A penicilina é um dos antibióticos mais

difundidos e utilizados no tratamento de enfermidades animais. Porém, nos resultados obtidos pelo teste de difusão em discos (antibiograma), esta droga se mostrou pouco eficiente com 90% (27/30) dos espécimes demonstrando resistência a este antibiótico. A ampicilina, um beta-lactâmico de segunda geração demonstrou o mesmo comportamento da penicilina. Brito et al. (2001) encontraram resistência a ampicilina e a penicilina G em 65% dos *Staphylococcus aureus* isoladas de infecções mamárias.

A resistência dos *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos tem sido relatada em ambiente hospitalar humano. Estudo conduzido por Sadoyama; Gontijo-Filho (2000) demonstrou alta porcentagem de multiresistência nos *Staphylococcus* isolados de infecções nosocomiais. Os níveis de resistência aos antimicrobianos das cepas de *Staphylococcus* spp isoladas neste estudo são menores que os observados em cepas provenientes de hospitais humanos. Apesar disso, eles são preocupantes, com índices de resistência de 26,6% (8/30) para a eritromicina; 16,6% (5/30) a rifampicina, 6,6% (2/30) a tetraciclina, cloranfenicol e oxacilina e 3,3% (1/30) para ciprofloxacina, clindamicina e cefalotina (Tabela 1). Uma cepa coagulase positiva foi resistente a sete antibióticos e uma coagulase negativa a cinco, sendo a primeira resistente a oxacilina e a segunda, sensível.

Também foram observados resultados intermediários nos testes de suscetibilidade às drogas, com 30% (9/30) para eritromicina; 23,3% (7/30) ao cloranfenicol e clindamicina; 6,6% (2/30) para tetraciclina e ciprofloxacina; 3,3% (1/30) a rifampicina e cefalotina. Provavelmente, a pressão de seleção a que esses microrganismos são submetidos, principalmente pelo uso inadequado de drogas poderá induzir à resistência em curto prazo.

Espécimes de *Staphylococcus* spp que possuem resistência a oxacilina possuem também resistência intrínseca a outros antimicrobianos (PIRIZ et al., 1995), o que foi confirmado neste estudo. Estas cepas representam um desafio terapêutico e de saúde pública, que justificam sua vigilância epidemiológica (BOYCE, 1992).

Dois cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram resistência a oxacilina, nos métodos de difusão em ágar e ágar de triagem. A CMI obtida para essas amostras foi de 512mg/mL e 1028mg/mL, respectivamente e são semelhantes às observadas nas cepas isoladas em hospitais humanos (SADOYAMA; GONTIJO-FILHO, 2000). Apesar da baixa porcentagem (6,6%), este resultado é altamente expressivo, já que a única

opção terapêutica para estas cepas é o uso da vancomicina, droga restrita ao uso hospitalar humano e vetada para tratamento de animais.

Os resultados obtidos no ágar de triagem foram idênticos aos obtidos no teste de susceptibilidade em discos e foram confirmados pela CMI. Estes resultados indicam que este teste é adequado para triagem de espécimes de estafilococos resistentes a oxacilina.

Foi observada diferença estatística na resistência aos antibióticos testados, quando os estafilococos coagulase positiva e negativa foram comparados. Os estafilococos coagulase negativa apresentaram maior resistência a eritromicina, rifampicina, tetraciclina e cloranfenicol ( $p < 0,05$ ). Vários autores afirmam que os estafilococos coagulase negativos possuem fatores genéticos que favorecem a aquisição de resistência (KONEMAN et al., 1997 e TORTORA et al., 2002). Provavelmente, essas características, somadas ao contato com antibióticos (MARTINS, 1999 e BRITO et al., 2001) foram os principais fatores predisponentes ao perfil de resistência observado na presente investigação científica.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que *Staphylococcus* spp foi o agente etiológico mais frequentemente isolado (60%) das infecções mamárias recorrentes nos rebanho estudado, com muitos espécimes isolados apresentando perfil de multiresistência aos antibióticos; a resistência a oxacilina determinada em dois espécimes de *Staphylococcus* coagulase positiva foi confirmada por três testes diferentes e caracterizaram a necessidade constante de vigilância epidemiológica e conscientização dos produtores e médicos veterinários para o uso indiscriminado de antibióticos e conseqüente emergência de cepas multirresistentes.

## Frequency and antimicrobial susceptibility of *staphylococcus* spp isolated from mastitis's dairy cows in the region of Uberlândia-MG

### ABSTRACT

In farms located in Uberlândia-MG, Brazil, fifty samples of milk were collected from cows with clinical or subclinical recurrent mastitis to verify the presence of *Staphylococcus* spp and susceptibility to the antimicrobials. In 60% (30/50) of the sam-

ples *Staphylococcus* spp was isolated, showing the incidence of this microorganisms. Antimicrobial susceptibility tests showed that 90% (27/30) of the strains were resistant to penicillin and ampicilin, 26,66% (8/30) to erythromycin, 16,66% (5/30) to riphamicin, 6,66% (2/30) to tetracycline, chloramphenicol and oxacilin, and 3,33% (1/30) to ciprofloxacin and clindamicin. The resistance isolated to oxacilin, was confirmed for minimum inhibitory concentration were coagulase positive, representing 10% (2/20) of the strains. The results evidenced high resistant between the strains isolated, strengthening the importance of the adequate and monitored use of antibiotics, since these microorganisms can be spread by milk and transform into serious problem of public health.

**Keywords:** Bovine mastitis, *Staphylococcus* spp, resistance, antimicrobial.

## REFERÊNCIAS

AMYES, B.G.S.; GEMMEL, C.G. Antibiotic resistance. Review article. **Journal of Medicine Microbiology**, v. 46, p. 436-470, 1997.

BOYCE, J.M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: microbiology, epidemiology, and preventive measures. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.13, p.725-737, 1992.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M.A. S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

BRITO, M.A.V.P.; CAMPOS, G.M.M.; BRITO, J.R.F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p-79-82, 2002.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, p.781-791, 1997.

COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. Mastite subclínica: prejuízos causados e os custos de prevenção em propriedades leiteiras. **Rev. NAPGAMA**, v.2, p16-20, 1999.

- CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; SILVA, D. R.; OLIVEIRA, A. A.; SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana de agentes contagiosos e ambientais isolados de mastite clínica e subclínica de búfalas. **Arquivo Instituto de Biologia**, v.73, n.1, p.17-21, 2006.
- DETILLEUX, J.C. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 103-110, 2002.
- FONSECA, L.F.L. **Estudo da prevalência da mastite bovina e sua relação com práticas de manejo, higiene e terapia em fazendas produtoras de leite tipo B no Estado de São Paulo**. 1992. 148f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens, ESALQ, Universidade de São Paulo.
- FONSECAL.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, SP: Lemos Editorial, 2000, 176p.
- FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R.A. Perfil de Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Instituto de Biologia**, v. 72, n. 2, p.171-177, 1995.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHECKENBERGER, P. C.; WINN JUNIOR, N.C. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5.ed. Philadelphia: Lippencott – Ravon, 1997. 1448p.
- LANGENEGGER, H.; COELHO, N.M.; HANGENEGGER, C.H.; CASTRO, R. P. Estudo da incidência de mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.437, 1970.
- LEE, J.H. Methicillin (oxacillin) – resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p.6487-6494, 2003.
- MARTINS, S.C.S. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares: Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, v.12, n.56, p.45-48, 1999.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard M2-A5 NCCLS, Villanova, PA, 2000a.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY PERFORMANCE STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard M<sub>7</sub>-A<sub>4</sub> NCCLS, Villanova, PA, 2000b.
- PIRIZ, S.L.F.; VALLE, J.; MATEOS, E.; HURTADO, M.A.; CID, D.; RUIZ-SANTAQUITERIA; J. A.; VADILLO, S. Comparative *in vitro* activity of 11 B-lactam antibiotics against 91 *Staphylococcus intermedius* strains isolated from Staphylococcal dermatitis in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**, v.42, p.293-300, 1995.
- PRESTES, D.S.; FILATI, A.; CECIM, M.S. Suscetibilidade à mastite: Fatores que a influenciam – uma revisão. **Revista Faculdade Zootecnia Veterinária e Agronomia**, v.9, n.1, p-48-59, 2003.
- PYORALA, S. New strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, n.4, p.211-216, 2002.
- RABELLO, R.F. **Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no Estado do Rio de Janeiro**. 2003. 100p. Dissertação (Mestrado em Produção) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- SADOYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P.P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, v.4, n.2, p.135-143, 2000.
- SAHM, D.F. Streptococci and staphylococci: laboratory considerations for *in vitro* susceptibility testing. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 16, p. 9-14, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: UFMG, 1998. 221p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 2.ed., São Paulo: Varela, 2001. 317p.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**,

2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 646p.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CHRISTINE, L. **Microbiologia**, 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.

WAAGE, S.; MORK, T.; ROROS, A.; AASLAND, D.; HUNSHAMAR, A.; ODGAARD, S. A. Bacteria associated with clinical mastitis in dairy heifers. **Journal Dairy Science**, v.82, n.4, p. 712-719, 1999.