

Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite

Elisangela Zanette*
Diane Scapin**
Eliandra Mirlei Rossi****

Resumo

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes das mastites do rebanho leiteiro em vários países do mundo. O aparecimento de cepas multirresistentes a antibióticos tem dificultado o tratamento dessas infecções. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, isolados de 55 amostras de leite de vacas com suspeita de mastite no Extremo-Oeste catarinense. Foram inoculados 1 mL de cada amostra em caldo Infuso Cérebro Coração, incubados a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram estriadas em Ágar Sangue e Ágar Sal Manitol, incubadas à $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e testes bioquímicos. O antibiograma foi realizado por meio da técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer, conforme Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Foram testados os seguintes antibióticos: penicilina, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoina, rifampicina, sulfazotrina, tetraciclina, vancomicina e gentamicina. Das 55 amostras, 39 (70,9%) foram positivas para *Staphylococcus aureus*. Os percentuais gerais de sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária foram 78,72%, 13,59% e 7,69%, respectivamente. Os antibióticos mais eficazes foram ciprofloxacina e sulfazotrina, com 97,44% de eficácia e vancomicina, com 94,87%, e os menos eficazes foram a penicilina, com 46,15% de resistência e tetraciclina, com 30,77%. Conclui-se que *S. aureus* é um dos principais agentes etiológicos causadores de mastite, com resistência a diversos antimicrobianos. Assim, a análise antimicrobiana *in vitro* deve ser considerada pelos proprietários rurais para reduzir perdas na produção leiteira e em programas de controle da doença em questão. Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*. Mastite. Suscetibilidade antimicrobiana.

1 INTRODUÇÃO

A mastite é reconhecida como uma das doenças endêmicas que causam prejuízos econômicos à produção leiteira de todo mundo (PINHEIRO DE SÁ et al., 2004; GUILLOUX; CARDOSO; CORBELLINI, 2008; ZAFALON et al., 2007). Caracteriza-se como um processo inflamatório da glândula mamária, geralmente de caráter infeccioso, podendo ser classificada como mastite clínica ou subclínica (RIBEIRO et al., 2003).

* Bióloga; Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina Campus de São Miguel do Oeste; eli.zanette@bol.com.br

** Bióloga; Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina Campus de São Miguel do Oeste; dianescapin2005@yahoo.com.br

*** Bióloga; Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina Campus de São Miguel do Oeste; Especialista em Tecnologia e Controle de Qualidade de Alimentos pela Universidade de Passo Fundo; Mestranda do Programa de Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul; coordenadora dos Laboratórios do Curso de Ciências Biológicas e professora da Universidade do Oeste de Santa Catarina; Rua Oiapoc, 211, Bairro Agostini, São Miguel do Oeste; eliandra_bio@yahoo.com.br

Entre os microrganismos, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp. são citados como os principais patógenos associados à mastite subclínica no Brasil, seguidos dos *Streptococcus* sp, *Corynebacterium bovis* e bactérias do grupo coliformes, porém este com menor frequência (HARMON, 1994; PINHEIRO DE SÁ et al., 2004; MARTINS; MARQUES; NETO, 2006).

Pela sua ampla distribuição nos rebanhos leiteiros, os estafilococos representam um risco eminente aos consumidores de produtos lácteos, em razão do seu elevado potencial de produção de enterotoxinas resistentes aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite (MARTINS; MARQUES; NETO, 2006).

As principais causas do uso de antimicrobianos em pecuária leiteira são para o controle e o tratamento das mastites. Contudo, na maioria das vezes, os antimicrobianos são utilizados de forma errônea e abusiva, o que contribui para o aumento da resistência dos patógenos, dificultando o tratamento dessas infecções. Possivelmente os antimicrobianos utilizados em animais de produção contribuem para gerar cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão de produtos de origem animal (WHITE; MCDERMOTT, 2001). Outra consequência é a presença de resíduos de antibióticos no leite, o que pode ocasionar uma série de problemas ao consumidor, como a ocorrência de reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em indivíduos mais sensíveis, caracterizando outro relevante risco à saúde pública (MARTINS; MARQUES; NETO, 2006).

S. aureus, além de ser responsável por grandes prejuízos à pecuária leiteira, apresenta resistência a diversos antibióticos utilizados rotineiramente no tratamento da doença. Dessa forma, é de grande importância o isolamento e identificação desse agente em laboratórios e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana para melhor controle por meio de terapêutica adequada (FREITAS et al., 2005). Segundo Brito et al. (2001), diversos estudos que abordaram a suscetibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam para um aumento crescente no padrão de resistência. Logo, o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessário (SABOUR et al., 2004).

Diante disso e sabendo que a região do Extremo-Oeste catarinense é reconhecida como uma grande bacia leiteira, torna-se importante a pesquisa de *S. aureus* como causador de mastite, bem como a determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, facilitando o controle dessa infecção na pecuária leiteira da região estudada.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 55 amostras de leite de vacas com suspeita de mastite, durante o período de março a outubro de 2007, em propriedades rurais da região Extremo-Oeste de Santa Catarina. As amostras foram coletadas assepticamente em frascos estéreis; procedeu-se à assepsia do úbere, desprezando-se os três primeiros jatos e coletou-se uma quantidade aproximada de 200 mL de leite, a qual foi mantida sob refrigeração e conduzida ao Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico de Microbiologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina *Campus* de São Miguel do Oeste para análise.

Posteriormente, foram inoculados 1 mL de cada amostra em tubos contendo caldo BHI. As amostras foram incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h. Após, foram estriadas em Ágar Sangue e Ágar Sal Manitol, incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 48 h. Colônias características foram identificadas por coloração de Gram e testes bioquímicos, conforme Koneman et al. (2001), MacFaddin (2000) e Holt et al. (2000).

O Antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer, conforme Clinical and Laboratory Standards Institute (2005). Foram testados os seguintes antibióticos: Tetraciclina (30µg), Sulfazotrin (25µg), Clindamicina (2µg), Oxacilina (1µg), Penicilina G (10U), Vancomicina (30µg), Nitrofurantoína (300µg), Ciprofloxacina (5µg), Gentamicina (5µg) e Eritromicina (15µg). Para controle positivo, foi utilizada a cepa ATCC (25923) de *Staphylococcus aureus*.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 55 amostras de leite com suspeita de mastite avaliadas, 39 amostras (70,9%) apresentaram crescimento de *Staphylococcus aureus*.

Esse resultado é condizente com os descritos na literatura, pois vários trabalhos têm apontado *Staphylococcus aureus* como um dos principais agentes causadores de mastite no Brasil (ANDRADE et al., 2000; GUILLOUX; CARDOSO; CORBELLINI, 2008). Em levantamentos epidemiológicos nacionais e internacionais, *S. aureus* está presente em cerca de 50% das infecções da glândula mamária dos bovinos leiteiros (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A alta frequência de *S. aureus* nos casos de mastite pode ser explicada pelo fato de que a pele do úbere e a dos tetos são os principais sítios de localização desses agentes, o que acaba facilitando as infecções por esse microrganismo (MYLLYS et al., 1997).

Apesar de medidas preventivas evitarem a transmissão do patógeno de um animal a outro e reduzirem a incidência da doença, as infecções oriundas de outras fontes, como a ordenhadeira, o ar, a pele do animal e humanos, são fatores que contribuem para a manutenção da doença no rebanho (ZADOKS et al., 2002).

Em relação à suscetibilidade, foram encontrados os percentuais gerais de 78,72%, 13,58% e 7,69%, respectivamente, para sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária para as cepas analisadas.

Os antibióticos mais eficazes foram o sulfazotrin e ciprofloxacina, com 97,44% de eficácia e vancomicina, com 94,87%. Já os menos eficazes foram penicilina, com 46,15% de resistência, tetraciclina, com 30,77% e clindamicina, com 20,51% (Tabela 1). Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Erskine et al. (2002), com média de 49,6% de resistência à penicilina, durante os anos de 1994 à 2000. Diferentemente dos resultados desta pesquisa, Costa et al. (2000) encontraram 93,18% de resistência para esse antibiótico. Assim, esses resultados corroboram com a ideia de que os estafilococos isolados de leite de vacas com mastite quase sempre apresentam altos índices de resistência à penicilina (ANDRADE et al., 2000; COSTA et al., 2000; BYARUGABA, 2004).

A resistência encontrada para penicilina e tetraciclina no presente estudo foi similar à reportada por Araújo (1998), que encontrou 43,8% e 19,9% das cepas resistentes a esses antibióticos, respectivamente. Essa resistência encontrada para esses dois antibióticos justifica-se em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) na medicina veterinária, pois são frequentemente utilizados para controle de mastite (ANDRADE et al., 2000).

Tabela 1: Análise geral do perfil de sensibilidade antimicrobiana de 39 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de amostras de leite de vacas com mastite no Extremo-Oeste de Santa Catarina, 2007

Antibióticos	Resistente (%)	Intermediário (%)	Sensível (%)
Penicilina	46,15	-	53,85
Tetraciclina	30,77	20,51	48,72
Clindamicina	20,51	23,08	56,41
Oxacilina	10,26	-	89,74
Eritromicina	7,69	10,26	82,05
Rifampicina	7,69	10,26	82,05
Vancomicina	5,13	-	94,87
Nitrofurantoína	2,56	12,82	84,62
Ciprofloxacina	2,56	-	97,44
Sulfazotrin	2,56	-	97,44

Freitas et al. (2005), em seu estudo no Agreste do estado de Pernambuco, observaram alta eficácia para a vancomicina, 100% de sensibilidade, para cepas de estafilococos coagulase positiva isoladas de mastite bovina, enquanto que neste estudo foi encontrado um percentual de 94,87% de sensibilidade. Essa redução

de sensibilidade para vancomicina também foi relatada por Nader Filho et al. (2007); apenas 72,2% das cepas apresentaram sensibilidade para esse antimicrobiano, comprovando que o uso constante de antibióticos pode contribuir para o desenvolvimento de cepas resistentes.

Das 39 amostras positivas para *S. aureus* pesquisadas, nove (23,07%) apresentaram multirresistência, variando de três a oito antimicrobianos, fator que pode acarretar dificuldade no tratamento dos animais doentes e, conseqüentemente, agravar as perdas econômicas decorrentes dessa enfermidade, pois muitos dos antibióticos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre tais microrganismos (NADER FILHO et al., 2007).

De acordo com Sol et al. (2000) e Zafalon et al. (2007), a possibilidade de cura depende da estirpe bacteriana ou do animal. Algumas amostras de *S. aureus* parecem ser mais sensíveis ao tratamento do que outras e, também, algumas vacas se recuperam melhor, tratadas ou não. Assim, vários fatores podem interferir na cura bacteriológica quando se utiliza a terapia com antibióticos, seja em razão do estágio da ocorrência da infecção, seja da presença de bactérias em abscessos, além da incapacidade de defesa das células (ZAFALON et al., 2007).

4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que *S. aureus* é um dos principais agentes infecciosos isolados de amostras de leite com suspeita de mastite, com resistência a diversos antibióticos. Essa resistência pode estar associada ao uso errôneo e abusivo dos antimicrobianos na medicina veterinária, permitindo, assim, a seleção de cepas multirresistentes.

Os resultados encontrados ressaltam a importância da avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite bovina antes da indicação do tratamento para os animais, para melhor controle mediante terapêutica adequada.

Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from milk samples of bovines with suspect mastitis

Abstract

Staphylococcus aureus is one of the main agents of mastitis from milk herd in several countries in the world. The appearance of multiresistant strains at antibiotics has diffculted the treatment of these infections. Thus, the objective this study was to evaluate the profile of antimicrobial susceptibility from *Staphylococcus aureus*, isolated of 55 samples of cows milk with mastitis suspect in the extreme west of Santa Catarina. Were inoculated 1mL of each sample in Brain Heart Infusion Broth, incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 hours. Later the samples were inoculated in Blood Agar and Salt Mannitol, incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hours. Characteristic colonies had been identified by Gram coloration and biochemists tests. The susceptibility profile of the antimicrobials was carried through the technique of disc diffusion described for Kirby- Bauer, according to Clinical and Laboratory Standarts Institute, 2005. The following antibiotics were tested: penicillin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, nitrofurantoin, rifampicin, sulphazotrin, tetracycline, vancomycin and gentamicin. Of these, 55 samples, 39 (70,9%), were positive for *Staphylococcus aureus*. The general percentages of sensitivity, resistance and intermediate sensitivity were 78,72%, 13,59% and 7,69%, respectively. The antibiotic more efficient was ciprofloxacin and sulphazotrin with 97,44% of effective and vancomycin with 94,87% and the least effective was penicillin with 46,15% of resistance and tetracycline with 30,77%. *S. aureus* is one the main causing agents of mastitis, with resistance at diverse antimicrobials. It is possible to conclude that, the antimicrobial analysis *in vitro* must be considered by the agricultural proprietors, to reduce losses in the milk production and in programs of control of the disease in question.

Keywords: *Staphylococcus aureus*. Mastitis. Antimicrobial susceptibility.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. A. et al. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.
- ARAÚJO, W. P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 161-165, 1998.
- BRITO, M. A. V. P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v. 53, n. 5, p. 531-537, 2001.
- BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. **International Journal Antimicrobial Agents**, Uganda, v. 24, p. 105-110, 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Pennsylvania, 2005. Fifteenth Informational Supplement.
- COSTA, E. O. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from Mammary Parenchymas of Slaughtered Dairy Cows. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v. 47, p. 99-103, 2000.
- ERSKINE, R. J. et al. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **Journal Dairy Science**, Washington, v. 85, p. 1111-1118, 2002.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1315-1320, 2004.
- FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- GUILLOUX, A. G. A.; CARDOSO, M. R. I.; CORBELLINI, L. G. Análise epidemiológica de um surto de mastite bovina em uma propriedade leiteira no estado do Rio Grande do Sul. **Acta Scientiae Veterinarie**, Rio Grande do Sul, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2008.
- HARMON, R. J. Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. **Journal of Dairy Science**, Lexington, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.
- HOLT, J. G. et al. **BERGEY'S manual of determinate bacteriology**. 9. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas colorido. 5. ed. Medsi: Rio de Janeiro, 2001.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identifications of medical bacteria**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MARTINS, R. P.; MARQUES, M. R. H.; NETO, A. C. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 13, p. 104-110, 2006.

MYLLYS, V. et al. Persistence in bovine mastitis of Staphylococcus aureus clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. **Veterinary Microbiology**, Finlândia, v. 51, p. 245-251, 1997.

NADER FILHO, A. et al. Sensibilidade Antimicrobiana dos Staphylococcus aureus isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

PINHEIRO DE SÁ, M. E. et al. Importância do Staphylococcus aureus nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 41, p. 320-326, 2004.

RIBEIRO, M. E. R. et al. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 3, p. 287-290, 2003.

SABOUR, P. M. et al. Molecular Typing and distribution of Staphylococcus aureus isolates in eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, Canadá, v. 42, n. 8, p. 3449-3445, 2004.

SOL, J. et al. Factors associated with cure after therapy of clinical mastitis caused by Staphylococcus aureus. **Journal of Dairy Science**, Netherlands, v. 83, n. 2, p. 278-284, 2000.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 151-155, 2001. E. Suppl.

ZADOKS, R. N. et al. Comparison of Staphylococcus aureus isolates from bovine and human skin, milking equipment, and bovine milk by phage typing, pulsed-field gel electrophoresis, and binary typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Canadá, v. 40, n. 11, p. 3894-3902, 2002.

ZAFALON, L. F. et al. Mastite subclínica causada por Staphylococcus aureus: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 3, p. 577-585, 2007.