

PERFIS DE RESISTÊNCIA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS NO LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA¹

LUIZ FRANCISCO ZAFALON², ANTÔNIO NADER FILHO³, JOSÉ VÍCTOR DE OLIVEIRA⁴, FLÁVIO DUTRA DE RESENDE⁴

¹Recebido para publicação em 09/05/05. Aceito para publicação em 09/09/05.

²Centro de Análise e Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Bovinos de Leite, Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil. E-mail: zafalon@iz.sp.gov.br

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", FCAV, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil.

⁴Pólo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios da Alta Mogiana, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo Av. Rui Barbosa s/nº, Caixa postal 35, CEP 14770-000, Colina, SP, Brasil

RESUMO: *Staphylococcus aureus* é considerado o mais importante agente etiológico infeccioso da mastite bovina, havendo redução da produção de leite e possibilidade de perda de função dos quartos mamários acometidos. Efetuou-se o presente estudo visando verificar os perfis de resistência de *S. aureus* isolados de 66 quartos mamários com mastite bovina frente à ampicilina (10 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (30 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI), sulfazotrim (25 µg) e tetraciclina (30 µg). As estirpes foram classificadas em grupos da seguinte maneira: "A", resistentes à ampicilina e/ou à penicilina; "B", resistentes à ampicilina e/ou à penicilina e/ou à oxacilina; "C", resistentes à sulfadiazina mais trimetoprim; "D", sem resistência aos antimicrobianos testados. Dentre as 66 amostras testadas, 87,9% apresentaram resistência aos beta-lactâmicos e 40,9% foram resistentes à oxacilina. Dentre *Staphylococcus aureus* isolados em quartos mamários com mastite recidivante, quatro até então classificados como pertencentes ao grupo "A" passaram a ser classificados dentro do grupo "B", uma amostra que era agrupada como "A" passou a pertencer ao grupo "D", uma do grupo "B" passou para o grupo "A", enquanto três amostras continuaram a ser classificadas no mesmo grupo, sendo duas dentro do grupo "A" e uma no grupo "D". *S. aureus* demonstrou maior resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos, como a penicilina, ampicilina e oxacilina (77,3%, 68,2% e 40,9%, respectivamente), enquanto os maiores índices de sensibilidade foram encontrados para a gentamicina, sulfa mais trimetoprim, clindamicina e eritromicina (97,0%, 96,3%, 95,6% e 94,4% respectivamente).

Palavras-chave: antibióticos, leite, resistência, *Staphylococcus aureus*.

RESISTANCE PROFILES OF *Staphylococcus aureus* ORIGINATING IN MILK FROM COWS WITH SUBCLINICAL MASTITIS

ABSTRACT: *Staphylococcus aureus* is considered the most important infectious agent of bovine mastitis. Milk production is reduced and the ill mammary quarters are the most important reservoirs of the pathogen. The objective of this study was to verify the resistance profiles of *S. aureus* isolated from 66 quarters with bovine mastitis to ampicillin (10 µg), clindamycin (2 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (30 µg), oxacillin (1 µg), penicillin (10 UI), sulfa plus trimethoprim (25 µg) and tetracycline (30 µg). The isolates were classified in groups: "A", resistant to ampicillin and/or penicillin; "B", resistant to ampicillin and/or penicillin and/or oxacillin; "C", resistant to sulfa plus trimethoprim; "D", sensitivity to all antimicrobials tested. Among 66 isolates, 87.9% showed resistance to b-lactams and 40.9% were resistant to oxacillin. Among isolates of mammary quarters

with new cases of mastitis, four classified in the group "A" changed to the group "B", one classified in the group "A" changed to the group "D", one of the group "B" changed to the group "A", while three isolates continued in the same group, two in the group "A" and other in the group "D". The *S. aureus* isolates showed higher resistance to b-lactams antimicrobials, as penicillin, ampicillin and oxacillin (77.3%, 68.2%, 40.9%, respectively), while the higher sensitivities registers were to gentamicin, sulfa plus trimethoprim, clindamycin and erythromycin (97.0%, 96.3%, 95.6% and 94.4%, respectively).

Key words: antibiotics, milk, resistance, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus constitui-se no principal agente infeccioso da mastite bovina, com grande repercussão econômica. A penetração do agente pelo canal do teto e a sua multiplicação na glândula levam à diminuição na produção de leite e, ocasionalmente, perda da função da glândula mamária (SCHALM *et al.*, 1971).

Em alguns países, a incidência de mastite por *S. aureus* foi reduzida, sendo, no entanto, o microrganismo ainda mais comumente isolado. Um indicativo da habilidade do *S. aureus* de se adaptar a novas condições é o aumento da ocorrência de casos de mastite em novilhas que são causados por este microrganismo.

Por ser a mastite a enfermidade mais frequente e dispendiosa do gado leiteiro, o prejuízo dela decorrente atinge cifras elevadas em consequência da redução na produção de leite e dos prejuízos na composição físico-química que podem inutilizar o produto para o consumo ou mesmo para o beneficiamento. Além disso, existem os gastos com medicamentos, com a desvalorização do animal e com a precária qualidade sanitária do leite (STEHLLING *et al.*, 1986).

O exame bacteriológico do leite, obtido a partir de um único quarto ou de amostras compostas é o procedimento padrão para se estabelecer se há infecção (ELVINGER e NATZKE, 1992). Nos casos de surtos de mastite clínica em um rebanho ou em casos isolados, especialmente em vacas de alto valor zootécnico, o isolamento do agente etiológico é o método diagnóstico de eleição. A cultura do leite de vacas do rebanho é útil no monitoramento da prevalência e dos agentes etiológicos presentes (SEARS *et al.*, 1993).

Vários testes podem ser utilizados para a identi-

ficação de *S. aureus*, diferenciando-o de outros estafilococos. SILVA e GANDRA (2004) chamam a atenção para a análise de resultados em conjunto para a discriminação das espécies. Além disso, é necessário o conhecimento dos padrões de resistência antimicrobiana do microrganismo. Esta conduta é fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos que sejam efetivos, assim como para a construção de estratégias de tratamento quando forem necessárias (SABOUR *et al.*, 2004).

Diante do exposto, objetivou-se verificar os perfis de resistência de *S. aureus*, isolados em quartos mamários de vacas com mastite, a antimicrobianos do grupo dos beta-lactâmicos, além de proceder-se ao acompanhamento destes quartos com o intuito de averiguar possíveis mudanças nos padrões encontrados.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido em uma propriedade produtora de leite do tipo "C", localizada na região de Barretos, Estado de São Paulo, cuja produção de leite era de, aproximadamente, oito litros diários por animal. Foram acompanhados 66 quartos mamários de vacas com mastite em que houve o isolamento prévio de *S. aureus*, durante o período correspondente entre janeiro de 2001 e abril de 2002, com intervalos de cinco meses entre as visitas à propriedade.

As colheitas do leite foram realizadas utilizando-se tubos de ensaio esterilizados para os quartos mamários que apresentavam amostras de leite reagentes ao "California Mastitis Test" (CMT). As amostras foram transportadas para as análises laboratoriais após o acondicionamento em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo. Ao chegar ao laboratório, 10 µL de leite de cada quarto mamário foram semeados sobre a superfície de placas de Petri em duplicatas, contendo ágar san-

gue ovino a 5%, em aerobiose. Após a incubação a 37°C durante 24 a 48 horas, as colônias foram investigadas quanto às características de crescimento, coloração, além de serem submetidas aos esfregaços corados pelo método de Gram (HARMON *et al.*, 1990).

Os microrganismos sob a forma de cocos Gram-positivos, foram submetidos às provas da catalase e da coagulase lenta com plasma de coelho (HOLMBERG, 1973). Submeteu-se as amostras catalase e coagulase positivas à prova para verificação da produção de acetoina e aquelas que produziram acetoina foram testadas quanto à utilização ou não da maltose e trealose para a diferenciação entre *S. aureus* e *Staphylococcus schleiferi* subespécie *coagulans*. As amostras que mostraram-se positivas a estas provas, foram, então, classificadas como *S. aureus* (HOLT *et al.*, 1994).

Os microrganismos isolados foram submetidos aos testes de sensibilidade *in vitro*, utilizando a técnica de difusão com discos (BAUER *et al.*, 1966) em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton, em cuja superfície fora dispostos discos impregnados com os seguintes princípios ativos: ampicilina (10 µg), clindamicina (2 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (30 µg), oxacilina (1 µg), penicilina (10 UI), sulfazotrim (25 µg) e tetraciclina (30 µg). Decorridas 24 horas de incubação a 35°C, procedeu-se a aferição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos, segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2005).

Após os testes de sensibilidade, as amostras foram agrupadas de acordo com os seus perfis de resistência, da seguinte maneira: grupo "A", resistentes à ampicilina e/ou à penicilina; grupo "B", resistentes à ampicilina e/ou à penicilina e/ou à oxacilina; grupo "C", resistentes à sulfadiazina mais trimetoprim; grupo "D", sem resistência aos antimicrobianos testados

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerada uma doença multifatorial de grande importância para a pecuária de leite, a mastite acarreta sérios prejuízos econômicos decorrentes, dentre outros fatores, da diminuição da produção láctea. Sob o ponto de vista econômico, a mastite é a mais importante doença do gado leiteiro, apre-

sentando alta prevalência em todo o mundo. Além da forma clínica, a enfermidade apresenta-se, também, sob a forma subclínica, sendo esta mais prejudicial financeiramente com perdas econômicas devido à frequência e persistência do processo (VIANNI e LÁZARO, 2003).

Regras práticas para a seleção e uso de antimicrobianos são preocupações há algum tempo, com ênfase na necessidade de doses adequadas de princípios ativos e por períodos limitados, além do monitoramento dos padrões de sensibilidade para que problemas de resistência possam ser evitados (SANFORD, 1976). O uso inadequado de antibióticos para o tratamento da mastite favorece a pressão seletiva em cepas multi-resistentes (VIANNI e LÁZARO, 2003).

Considera-se o teste de sensibilidade "in vitro" um importante fator no sucesso do tratamento da mastite. Entretanto, é comum o uso indiscriminado de medicamentos sem a realização do mesmo, sujeitando a glândula mamária a tratamentos inadequados que podem ocasionar agravamento do processo e desenvolvimento de resistência por parte dos microrganismos (COSTA *et al.*, 1999).

No Quadro 1 constam os padrões de resistência encontrados nos microrganismos isolados dos quartos mamários.

Quadro 1. Classificação de *S. aureus* isolados de quartos mamários com mastite bovina, de acordo com a apresentação ou não de resistência aos grupos de antimicrobianos testados

Padrões de resistência	nº	%
A (Amp ¹ e/ou Pen ²) ^a	31	47,0
B (Amp e/ou Pen e/ou Oxa ³) ^a	27	40,9
C (Sut ⁴) ^a	2	3,0
D (Sem resistência aos princípios ativos testados)	6	9,1
Total	66	100,0

¹Ampicilina; ² Penicilina G; ³ Oxacilina; ⁴ Sulfa + trimetoprim.

^aAntimicrobianos aos quais as estirpes de *S. aureus* demonstraram resistência.

SABOUR *et al.* (2004) avaliaram um total de 212 *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina, 24,5%

dos quais foram resistentes pelo menos a um antimicrobiano, com a resistência à penicilina sendo a mais comum. No mesmo estudo, foram encontradas variações nos padrões de resistência em diferentes regiões, enquanto os níveis de resistência aos antimicrobianos dos microrganismos isolados nas amostras de leite, antes e depois do tratamento, foram similares.

De oito antimicrobianos testados no presente estudo, 68,2% dos microrganismos apresentaram resistência a mais de um princípio ativo. O perfil de resistência mais encontrado foi contra os antimicrobianos beta-lactâmicos (87,9% das amostras).

Quadro 2. Perfis de sensibilidade de *S. aureus* isolados de casos de mastite bovina frente a diferentes antimicrobianos

	Sensibilidade	Resistência
Gentamicina (66) ¹	97,0	3,0
Sulfadiazina + trimetoprim (54) ¹	96,3	3,7
Clindamicina (46) ¹	95,6	4,4
Eritromicina (65) ¹	94,4	4,6
Tetraciclina (65) ¹	89,2	10,8
Oxacilina (66) ¹	59,1	40,9
Ampicilina (66) ¹	31,8	68,2
Penicilina G (66) ¹	22,7	77,3

¹Número de quartos mamários estudados.

Nota-se que o princípio ativo ao qual os microrganismos apresentaram maior sensibilidade foi a gentamicina (97%). Entre os princípios ativos de maior resistência por parte das estirpes de *S. aureus*, figuraram a penicilina G, a ampicilina e a oxacilina (77,3%, 68,2% e 40,9%, respectivamente).

A resistência à penicilina e à ampicilina por parte de estirpes de *S. aureus* isoladas no leite foi encontrada, também, por outros autores, como ARAÚJO (1998) (43,8% e 44,8%, respectivamente) e BRITO *et al.* (2001) (65% para ambos os princípios ativos). Porém, estes mesmos autores não detectaram a resistência à oxacilina.

YOSHIMURA *et al.* (2002) também relataram resistência a um ou mais antimicrobianos em 37,4% de

S. aureus isolados e que o padrão de resistência à benzilpenicilina, dihidroestreptomicina e canamicina foi o mais freqüente. Estes mesmos autores não encontraram resistência à metilicina, lincomicina, clindamicina e florfenicol.

A seleção de bactérias resistentes pelo uso incorreto de antimastíticos, além das modificações biológicas introduzidas pelo próprio homem, podem explicar as diferenças encontradas na sensibilidade bacteriana (LANGONI *et al.*, 1991), o que torna difícil a comparação de resultados entre diferentes estudos.

Microrganismos que exibem resistência às penicilinas resistentes à penicilinase são classificados como *S. aureus* metilicina (oxacilina)-resistentes (“MRSA”). Tais microrganismos são, também, freqüentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo os aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas (MANDELL *et al.*, 1995).

De forma geral, quando o agente causador da mastite é *S. aureus*, a resistência mais comum observada é à penicilina, um dos antibióticos mais utilizados em vacas leiteiras. Segundo SOL *et al.* (2002), quando estirpes de *S. aureus* são resistentes à metilicina, elas apresentam como característica principal a multi-resistência a todos os antibióticos do grupo dos beta lactâmicos, além da resistência a outros antimicrobianos.

Para LEE (2003), isolados “MRSA” devem ser considerados resistentes a todas as cefalosporinas e outros β-lactâmicos (como ampicilina, amoxicilina-ácido clavulônico, ticarcilina-ácido clavulônico e os carbapenems) devido aos resultados dos testes de sensibilidade “in vitro” obtidos com estes agentes. Existem evidências clínicas de que os isolados de *S. aureus* resistentes à oxacilina não respondem ao tratamento *in vivo* com cefalosporinas. Desta forma, mostram-se preocupantes os achados do presente estudo, já que houve razoável quantidade de isolados resistentes à oxacilina.

Vários trabalhos relatam a possibilidade de transmissão de *S. aureus* entre o homem e os bovinos. A infecção do homem pelo consumo de produtos como o leite contaminado com linhagens “MRSA” de origem animal é aventada. Uma vez ocorrida a transferência interespecie, estes microrganismos podem tornar-se disseminados no meio animal.

Nas estirpes de *S. aureus* isoladas do leite dos animais estudados, 40,9% mostraram-se resistentes à oxacilina. A propriedade foi acompanhada a intervalos de cinco meses, em quatro visitas. Enquanto na primeira visita 21,05% dos isolados eram resistentes à oxacilina, nenhum apresentou resistência cinco meses depois. Decorridos outros cinco meses, todos eram resistentes, enquanto 66,7% dos isolados eram resistentes na última visita, após mais cinco meses. Entre nove quartos mamários com reinfecções que foram acompanhados, quatro apresentaram estirpes que passaram a apresentar resistência à oxacilina, sem tê-la apresentado anteriormente.

Segundo AMARAL *et al.* (1996), foi constatada múltipla resistência de estirpes de *S. aureus* que foram isoladas da água utilizada no processo de obtenção do leite em dez propriedades rurais localizadas na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo. Os autores classificaram tais achados preocupantes pelo papel da água como veiculadora de agentes infecciosos da mastite bovina, além de todos *S. aureus* isolados apresentarem-se como resistentes à oxacilina.

Durante o período de estudo não foi relatada a utilização de beta-lactâmicos para o tratamento de casos de mastite. Entre os mesmos nove quartos mamários que se mostraram reinfecções, demonstrou-se que uma estirpe de *S. aureus* deixou de apresentar resistência à ampicilina, dentre aquelas que a apresentavam anteriormente. Dentre os quartos que apresentavam estirpes com resistência a um ou mais beta-lactâmicos (oito quartos), sete continuaram a apresentar resistência a esta classe de antimicrobianos.

CONCLUSÕES

O isolamento de estirpes de *S. aureus* resistentes à oxacilina nas amostras de leite dos animais com mastite bovina alerta para a possível elevação deste perfil de resistência na área veterinária, tornando necessários estudos que monitorem o perfil epidemiológico do microrganismo, o que traria condições não só para o controle e prevenção da mastite bovina, mas também maior segurança à saúde humana.

AGRADECIMENTO

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 98/16087-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; *et al.* Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina, isolados da água utilizada no processo de obtenção do leite. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.48, n.5, p.525-532, 1996.

ARAÚJO, W.P. Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo v.35, n.4, p.161-165, 1998.

BAUER, A.W. *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

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 Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

COSTA, E.O. *et al.* Avaliação da terapia de mastite clínica: eficácia terapêutica medida em número de dias em tratamento. **Revista Napgama**, São Paulo, n.2, p.10-14, 1999.

ELVINGER, F.; NATZKE, R. Elements of Mastitis Control. In: VAN HORN, H. H.; WILCOX, C. J. **Large dairy management**. Champaign: American Dairy Science Association, 1992. p.440-447.

HARMON, R.J. *et al.* **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34 p.

HOLMBERG, O. *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk. **Acta Veterinaria Scandinava**, Copenhagen, v.45,(supl.), p.1-144, 1973

HOLT, J.G. *et al.* Gram-positive cocci. In: **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.544-551.

LANGONI, H. *et al.* Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v.43, n.6, p.507-515, 1991.

LEE, J.H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p. 6489-6494, 2003.

- MANDELL, G.; DOUGLAS, J.; BENNETT, R. **Principles and practices of infectious diseases**. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone Ltd., 1995.
- NCCLS. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Fifteenth Informational Supplement**, v.25, n.1, 2005.
- SABOUR, P.M. *et al.* Molecular Typing and Distribution of *Staphylococcus aureus* Isolates in Eastern Canadian Dairy Herds. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.8, p.3449-3455, 2004.
- SANFORD, J. The selection of antibiotics. **Veterinary Record**, London, v.99, p.61-64, 1976.
- SOL, J. *et al.* Sensitivity pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in the Netherlands from 1964 to 2001. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE QUALIDADE DO LEITE E CONTROLE DE MASTITE, 2, 2002, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: 1995. p.116.
- SCHALM, O. W.; CARROL, E. J.; JAIN, N. C. **Bovine Mastitis**. Philadelphia, Lea & Febiger, 360p, 1971.
- SEARS, M.P. *et al.* Procedures for mastitis diagnosis and control. In: HUNT, E.; ANDERSON, K. L. **Veterinary Clinical North America: Food Animal Practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, p.445-468, 1993.
- SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p.32-40, 2004.
- STEHLING, R.N. *et al.* Estudo da evolução da mastite caprina induzida por enterotoxina estafilocócica e estreptocócica. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 38, p. 701-717, 1986.
- VIANNI, M.C.E.; LÁZARO, N.S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite subclínica bubalina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v.23, n.2, p.47-51, 2003.
- YOSHIMURA, H.; ISHIMARU, M.; KOJIMA, A. Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. **Journal Veterinary Medicine**, Series B, v.49, n.9, p.457-460, 2002.