

# Susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de vacas com mastite em Sergipe

W. S. Neres<sup>1</sup>; O. M. Santos<sup>1</sup>; G. I. L. Tuñon<sup>1</sup>; M. R. P. Carneiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias Aplicadas, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão/SE, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Morfologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão/SE, Brasil  
wemersonmedvet@hotmail.com

(Recebido em 03 de outubro de 2014; aceito em 20 de outubro de 2014)

Este estudo objetivou avaliar a susceptibilidade antimicrobiana de isolados *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) de amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica em Sergipe. Foram isoladas cepas SCP a partir de amostras de leite de vacas com mastite, as quais foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão com discos. Do total de amostras coletadas, 92,7% (102/110) foram de animais com mastite subclínica e 7,3% (8/110), com mastite clínica. Foram obtidas 79 cepas SCP em 24,5% (27/110) das amostras. O antimicrobiano que apresentou maior resistência foi tetraciclina, observada em 41,7% (33/79) dos isolados e, resistência intermediária, em 1,3% (1/79). Resistência intermediária foi constatada também à ciprofloxacina, 21,5% (17/79) e eritromicina, 70,8% (56/79). Foi possível detectar a resistência à tetraciclina entre os isolados, além de correlacioná-la ao uso abusivo e inadequado deste antimicrobiano por produtores da região.

Palavras-chave: mastite, tetraciclina e resistência.

## Antimicrobial susceptibility of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from cows with mastites in Sergipe

This study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* coagulase positive (SCP) isolated from milk of cows with clinical and subclinical mastitis in Sergipe. SCP strains were isolated from milk samples of cows with mastitis, which were submitted to susceptibility testing to antibiotics by the diffusion method with disks. Of the samples collected, 92,7% (102/110) were from animals with subclinical mastitis and 7,3% (8/110) with clinical mastitis. SCP 79 strains were obtained at 24,5% (27/110) of samples. The antimicrobial resistance with the highest tetracycline was observed in 41,7% (33/79) of the isolates, and intermediate resistance in 1,3% (1/79). Intermediate resistance was also observed in ciprofloxacin, 21,5% (17/79) and erythromycin, 70,8% (56/79). It was possible to detect tetracycline resistance among isolates and to correlate it to the abusive and inappropriate use of this antimicrobial by producers in the region.

Key-words: mastitis, tetracycline and resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma afecção intramamária do gado leiteiro, de grande importância e prevalência, causada por agentes de caráter infeccioso, químico, mecânico ou térmico que agredem a glândula mamária gerando uma reação inflamatória<sup>2,6,10</sup>.

É responsável por altos custos de produção e comprometimento da sanidade e bem-estar animal, podendo se apresentar na forma clínica, onde há sinais de infecção sistêmica, bem como sinais clínicos locais, além de alterações macroscópicas do leite. Já na mastite subclínica ocorrem alterações na composição e quantidade de leite produzido<sup>2,10</sup>.

O agentes infecciosos que podem acarretar a mastite são principalmente bactérias do gênero *Staphylococcus*, como *Staphylococcus aureus*<sup>4,9</sup>. No entanto, outras espécies *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), como *S. intermedius* e *S. hyicus*, bem como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), podem participar da etiologia. Tal gênero destaca-se devido à elevada resistência aos antimicrobianos<sup>7,11</sup>.

Antimicrobianos são empregados na pecuária leiteira na prevenção, controle e tratamento das mastites. Entretanto, em sua maioria, os mesmos são utilizados de forma errônea e abusiva, contribuindo para o aumento da resistência dos patógenos e dificuldade no tratamento dessas

infecções, podendo contribuir no surgimento de cepas resistentes de microrganismos. Estudos que abordam a susceptibilidade a antimicrobianos de patógenos da mastite bovina no Brasil apontam um aumento crescente no padrão de resistência<sup>3,16,21</sup>.

A resistência múltipla a antimicrobianos constitui-se em grande agravante na terapêutica de infecções, fazendo da mastite causada por patógenos, uma enfermidade de difícil tratamento e controle, culminando em grandes gastos econômicos<sup>11</sup>.

Mediante o exposto, o presente estudo teve como objetivo determinar a susceptibilidade antimicrobiana de cepas SCP isoladas de leite de vacas com mastite clínica e subclínica no sertão sergipano, a fim de detectar a resistência, considerando um possível uso inadequado e abusivo de antimicrobianos nos rebanhos estudados.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Sergipe, sob o registro CEPA n.º 64/11.

Foram obtidas amostras de leite de vacas mestiças, em diferentes estágios de lactação, em propriedades rurais dos municípios de Monte Alegre de Sergipe, Nossa Senhora da Glória e Porto da Folha. Todas as referidas propriedades adotavam a prática da ordenha manual ou mecânica, uma ou duas vezes ao dia, sem ou com higienização pré e pós ordenha, para as ordenhas manuais e mecânicas, respectivamente.

A mastite clínica foi diagnosticada pela observação de alterações macroscópicas no úbere e no leite, já a subclínica, pelo CMT (*California Mastitis Test*), considerando-se qualquer grau de reação.

Uma vez detectada a mastite, os tetos enfermos foram higienizados com água e solução detergente, seguida de antissepsia com álcool a 70%. Foram desprezados os primeiros três jatos de leite e coletados 50 mL em frasco esterilizado antes do início da ordenha. Todas as amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica, contendo gelo reciclável e, transportadas para isolamento e identificação bacteriana, no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Morfologia (LABAC/DMO/CCBS/UFS).

As amostras foram cultivadas em placas com ágar sal manitol (OXOID), incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Em seguida, colônias que apresentaram coloração amarela foram semeadas em tubos com ágar nutriente (OXOID) inclinado e incubadas a 37°C por 24h. Após a incubação, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e realizadas as provas de produção de catalase e coagulase livre. Cocos Gram positivos dispostos em forma de cachos de uva, catalase e coagulase positivas foram classificados como *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP).

Foi avaliada a susceptibilidade aos antimicrobianos amoxicilina/ácido clavulânico (30µg), ampicilina/sulbactam (20µg), cefoxitina (30µg), ciprofloxacina (05µg), clindamicina (02µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), sulfazotrim (25µg), teicoplanina (30µg) e tetraciclina (30µg), pelo método de difusão com discos. Foram incubados a 37°C/24h e, em seguida, aferidos os halos de inibição para verificar os padrões sensível, intermediário e resistente, apresentados em valores de frequência absoluta e relativa<sup>5</sup>.

## 3. RESULTADOS

Foram coletadas 110 amostras de leite no período de julho de 2012 a julho de 2014, sendo 92,7% (102/110) obtidas de animais com mastite subclínica e 7,3% (8/110) de mastite clínica. Foram isoladas 79 cepas SCP em 24,5% (27/110) das amostras, nas demais não houve a formação de colônias ou cresceram colônias atípicas.

Todas as cepas foram sensíveis a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, cefoxitina, clindamicina, gentamicina, imipenem, sulfazotrim e teicoplanina. No padrão de resistência intermediária a ciprofloxacina se apresentou com 21,5% (17/79), a eritromicina 70,8% (56/79) e a tetraciclina 1,3% (1/79). O antimicrobiano menos eficaz foi a tetraciclina, que reportou resistência em 41,7% (33/79) dos isolados (Figura 1 e Tabela 1).

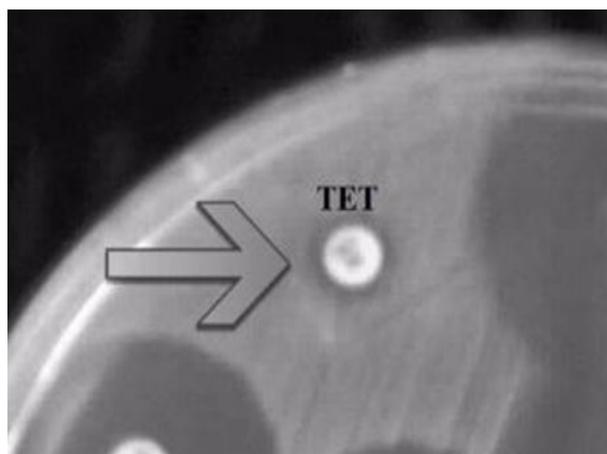


Figura 1: Detecção da resistência à tetraciclina (TET) dos isolados SCP (seta).  
 FONTE: LABAC, 2014.

Tabela 1: Frequência relativa e absoluta da susceptibilidade a antimicrobianos de cepas SCP isoladas do leite de vacas com mastite em Sergipe.

Antimicrobianos	Perfil		
	Sensível	Intermediário	Resistente
AMC	100% (79/79)	-	-
APS	100% (79/79)	-	-
CFO	100% (79/79)	-	-
CIP	78,5% (62/79)	21,5% (17/79)	-
CLI	100% (79/79)	-	-
ERI	29,2% (23/79)	70,8% (56/79)	-
GEN	100% (79/79)	-	-
IPM	100% (79/79)	-	-
SUT	100% (79/79)	-	-
TEC	100% (79/79)	-	-
TET	57% (45/79)	1,3% (1/79)	41,7% (33/79)

SCP- *Staphylococcus* coagulase positiva, AMC- amoxicilina/ácido clavulânico, APS- ampicilina/sulbactam, CFO- cefoxitina, CIP- ciprofloxacina, CLI- clindamicina, ERI- eritromicina, GEN- gentamicina, IPM- imipenem, SUT- sulfazotrim, TEC- teicoplanina e TET- tetraciclina. **FONTE: LABAC, 2014.**

#### 4. DISCUSSÃO

A frequência de SCP na etiologia da mastite bovina tem sido relatada em diversos estudos indicando estes agentes como prevalentes, especialmente a espécie *S. aureus*<sup>8</sup>. No presente estudo não foram identificadas espécies de SCP.

Em trabalho realizado na região Sul do Rio Grande do Sul, a presença de SCP se deu em 12,6% dos animais com mastite subclínica. Dentre o grupo, 85,7% corresponderam a *S. aureus*, enquanto 8,5% mostraram características bioquímicas compatíveis com *S. intermedius* e 5,8% foram consideradas *S. hyicus*<sup>1</sup>.

Estudo realizado no estado de Pernambuco para avaliar a frequência de *Staphylococcus* sp. na etiologia da mastite analisou 1080 amostras de leite bovino, das quais 740 (68,5%) foram positivas no exame microbiológico. Destas, bactérias do gênero *Staphylococcus* foram isoladas em 291 (39,3%), sendo 170 (58,4%) classificadas como SCN, 84 (28,9%) como *S. aureus* e 37 (12,7%) como SCP<sup>13</sup>.

No estado de Sergipe, durante o período de 2002 a 2003, foi realizado monitoramento microbiológico para a mastite em rebanhos leiteiros sendo 491 microrganismos isolados. Foram identificados *S. aureus* em 131 (26,28%); SCN, em 114 (23,22%); *Streptococcus agalactiae*, em 6 (1,22%); *Streptococcus* sp. *esculina* positivos, em 82 (16,70%); *Streptococcus* sp. *esculina*

negativos, em 37 (7,54%); *Corynebacterium* sp., em 90 (18,33%); *Pseudomonas* sp., em 5 (1,02%) e leveduras, em 26 (5,29%)<sup>14</sup>.

Em São Paulo, durante o período entre agosto de 2009 e março de 2010, foram examinadas amostras de leite mastítico a fim de verificar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos e ao extrato de própolis em isolados *S. aureus*. Os antimicrobianos mais eficientes foram gentamicina, cefalexina e ciprofloxacina com 100% de eficácia. Por outro lado, os menos eficazes foram tetraciclina e ampicilina com resistência de 10,82% e 13,51%, respectivamente<sup>17</sup>.

A sensibilidade encontrada no presente estudo se assemelha com a literatura disponível, onde foi observado baixo percentual de resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos supracitados<sup>18,19</sup>.

No presente trabalho não foi detectada multirresistência, o que requer um menor nível de preocupação na escolha terapêutica e concomitantemente, uma maior atenção, no intuito de evitar que patógenos adquiram esta capacidade, visto que cepas com esse perfil serão refratárias à maioria dos esquemas disponíveis para o tratamento das mastites em animais de produção<sup>18</sup>.

Estudo realizado em rebanhos leiteiros do município de Garanhuns/PE (2010), para determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de 83 amostras de *S. aureus* isoladas de mastite subclínica bovina, foi encontrada sensibilidade de 100% à cefalotina, 79 (95%) à enrofloxacin, 77 (93%) à tetraciclina, 76 (92%) à eritromicina e clindamicina, e 65 (78%) à gentamicina. No mesmo estudo, do total amostrado, 78 (94%) foram resistentes a duas ou mais drogas simultaneamente, reportando multirresistência<sup>18</sup>.

Dentre 39 isolados *S. aureus* em estudo realizado no Extremo-Oeste catarinense (2007) com avaliação do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *S. aureus* isolados de amostras de leite de vacas com suspeita de mastite, 9 (23,07%) apresentaram multirresistência de três a oito antimicrobianos<sup>20</sup>. Para *S. aureus* e SCP a multirresistência também foi relatada na região Agreste de Pernambuco, que variava de 69<sup>8</sup> a 100%<sup>12</sup> das cepas.

Os estudos para multirresistência no estado de Sergipe são escassos, constituindo-se em poucos dados para auxiliar na determinação do padrão de susceptibilidade antimicrobiana dos agentes envolvidos nas mastites bovinas. Não foram encontradas cepas que apresentassem multirresistência a antimicrobianos, visto que a única resistência encontrada foi à tetraciclina.

Em estudos disponíveis na literatura a resistência à tetraciclina não foi condizente<sup>15,18,19</sup>. No entanto, foi significativamente semelhante ao estudo supracitado realizado no Extremo-Oeste catarinense (2007), relatando 30,77% dos isolados resistentes<sup>20</sup>, e ao trabalho realizado no Agreste do estado de Pernambuco para perfil de sensibilidade antimicrobiana de 59 cepas de SCP isolados de leite de vaca com mastite, reportando 26% e 3% para perfil de resistência e resistência intermediária, respectivamente<sup>8</sup>.

A resistência à tetraciclina encontrada no presente estudo é devida ao uso indiscriminado e frequente de medicamentos compostos por este princípio ativo, assim como a disseminação empírica de sua eficácia entre os produtores dessa região, não só para o tratamento da mastite como de outras enfermidades na população bovina.

Por não existir controle da venda e uso de antimicrobianos veterinários no Brasil, a venda sem prescrição do médico veterinário facilita a comercialização dessas drogas. Consequentemente, isto contribui para o surgimento de resistência, devido à escolha inadequada da droga, via de administração, dosagem e duração do tratamento<sup>18</sup>.

Os dados obtidos nesse estudo evidenciam que o uso inadequado de antimicrobianos pode gerar resistência, seja por subdosagens ou período insuficiente de tratamento, uma vez que os ordenhadores das propriedades estudadas admitiram utilizar excessivamente e de forma inadequada a tetraciclina. Situação semelhante foi descrita na literatura, onde a resistência à gentamicina foi constatada por conta do uso de forma intensa e inadequada do referente antimicrobiano<sup>8,19</sup>.

## 5. CONCLUSÃO

A sensibilidade encontrada foi relativamente alta em relação aos diferentes antimicrobianos e de acordo com a literatura pertinente. No entanto, a tetraciclina foi o antimicrobiano que apresentou maior índice de resistência, assim como nos diversos estudos realizados.

Sugere-se o uso específico e consciente de antimicrobianos na pecuária leiteira, tendo-se em vista o tratamento da mastite e outras enfermidades, a fim de minimizar a aquisição da resistência bacteriana.

1. Bandeira FS, Picoli T, Zani JL, Silva WP, Fischer G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região Sul do Rio Grande do Sul. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. 2013; 80 (1): 1-6.
2. Barlow J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastites in dairy cattle. *Journal of Mammary Gland, Biology and Neoplasia*. 2011; 16(4): 383-407.
3. Brito MAVP, Brito JRF, SILVA MAS, Carmo RA. 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. 2001; 53(5): 531-537.
4. Capurro A, Aspán A, Unnerstad HE, Waller KP, Artursson K. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(1): 180-191.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Third Informational Supplement. 2014.
6. Fagundes H, Oliveira CAF. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2004; 34(4): 1315-1320.
7. Ferreira LM, Nader Filho A, Oliveira E, Zafalon LF, Souza V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastites subclínica bovina. *Revista Ciência Rural*. 2006; 36(4): 1228-1234.
8. Freitas MFL, Pinheiro Júnior W, Stamford TLM, Rabelo SSA, Silva DR, Silveira Filho VM, Santos FGB, Sena MJ, Mota RA. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do Estado de Pernambuco. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. 2005; 72(2): 171-177.
9. Keefe G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastites. *Journal of Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2012; 28(2): 203-2016.
10. Koskinen MT, Wellenberg GL, Sampimon OC, Holopainen J, Rothkamp A, Salmikivi L, Haeringen WA, Lam TJGM, Pyorala S. Fiel comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2010; 93(12): 5707:5715.
11. Nader Filho, A. Ferreira LM, Amaral LA, Rossi Junior OD, Oliveira RP. Sensibilidade Antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo. 2007; 74(1): 1-4.
12. Medeiros ES, Mota RA, Santos MV, Freitas MFL, Pinheiro Jr JW, Teles JAA. Sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* spp. isoladas do leite de vacas com mastite subclínica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29(7): 569-574.
13. Mota RA, Medeiros ES, Santos MV, Júnior JWP, Moura APBL, Coutinho LCA. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). *Ciência Animal Brasileira*. 2012; 13(1): 1-6.
14. Oliveira AA, Azevedo HC, Seixas LS, Lopes LB, Melo CB. Monitoramento microbiológico da mastite bovina em rebanho holandês na região dos tabuleiros costeiros do Estado de Sergipe, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 2010; 32(4): 193-197.
15. Oliveira CMC, Sousa MGS, Silva NS, Mendonça CL, Silveira JAS, Oaigen RP, Andrade SJT, Barbosa JD. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* 2011; 31(2): 104-110.
16. Sabour PM, Gill JJ, Lepp D, Pacan JC, Ahmed R, Dingwell R, Leslie K. Molecular Typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in eastern Canadian dairy herds. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(8): 3449-3445.
17. Saeki EK, Mello Peixoto ECT, Matsumoto LS, Marcusso PF, Monteiro RM. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato de própolis. *Acta Veterinaria Brasilica*. 2011; 5(3): 284-290.
18. Silva ER, Pereira AMG, Moraes WS, Santoro KR, Silva TRM. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador. 2012; 13(3): 701-711.

19. Zafalon LF, Arcaro JRP, Nader Filho A, Ferreira LM, Castelani L, Benvenuto F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. Ver. Inst. Adolfo Lutz. 2008; 67(2): 118-125.
  20. Zanett E, Scapin D, Rossi EM. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. Unoesc & Ciência – ACBS, Joaçaba. 2010; 1(1): 65-70.
  21. White DG, Mcdermott PF. Emergence and transfer of antibacterial resistance. Journal of Dairy Science. 2001; 84: 151-155.
-