

SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADOS NO LEITE DE VACAS COM MASTITE

A. Nader Filho, L.M. Ferreira, L.A. do Amaral, O.D. Rossi Junior, R.P. Oliveira

Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: nader@fcav.unesp.br

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo conhecer a sensibilidade antimicrobiana “in vitro” de 72 cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica, em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo. Os testes foram realizados pela técnica de difusão em discos padronizada por Kirby-Bauer. Os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina (98,6%) e a eritromicina (98,6%), seguidos pela estreptomicina (94,4%), oxacilina (84,7%), novobiocina (73,4%), vancomicina (72,2%), ampicilina (4,2%) e a penicilina (2,8%). Os resultados obtidos evidenciaram, ainda, que as 72 (100%) cepas estudadas apresentaram resistência a pelo menos 2 antibióticos ou quimioterápicos e que nenhum destes princípios ativos, agindo isoladamente, pode ser ativo contra qualquer das cepas experimentadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Staphylococcus aureus*, mastite bovina, antimicrobianos

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIC MILK. The purpose of this study was to determine the in-vitro susceptibility pattern of 72 *Staphylococcus aureus* strains, isolated from bovine mastitic milk. The calves were reared on 10 dairy farms in the state of São Paulo, Brazil. These strains were tested by the standardized disc diffusion method. The highest susceptibility was to gentamicin (98.6%) and erythromycin (98.6%), followed by streptomycin (94.4%), oxacillin (84.7%), novobiocin (73.4%), vancomycin (72.2%), ampicillin (4.2%) and penicillin (2.8%). Results showed that 72 (100%) strains were resistant to at least 2 antibiotics and chemotherapeutics. None of the active principles, acting alone, was effective against any of the strains tested.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, bovine mastitis, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina continua sendo um grande problema para a indústria leiteira, apesar das inúmeras pesquisas voltadas para o controle desta enfermidade (FREITAS *et al.*, 2005). A elevada ocorrência e as perdas econômicas decorrentes principalmente da diminuição da produção láctea (COSTA *et al.*, 2000), fazem com que esta enfermidade seja considerada a mais dispendiosa nas propriedades leiteiras (ANDRADE *et al.*, 2000).

Embora possa ser causada por inúmeros microrganismos os *Staphylococcus aureus* são reconhecidos como sendo os agentes etiológicos mais isolados em vários países do mundo (SÁ *et al.*, 2004). Observações semelhantes foram realizadas por LANGONI *et al.* (1998)

e BRABES *et al.* (1999) em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo.

Algumas características de virulência que contribuem para a persistência do *S. aureus* no tecido mamário (SANTOS *et al.*, 2003) e o uso inadequado de antibióticos que propicia o aparecimento de cepas multi-resistentes, são fatores que comprometem a eficiência do tratamento da mastite bovina causada por estes microrganismos (BARBERIO *et al.*, 2002).

Ainda que o controle desta enfermidade seja fundamentado na adoção de medidas higiênico-sanitárias, a antibioticoterapia pode exercer um importante papel especialmente se considerada a possibilidade da redução das infecções intramamárias e, a consequente eliminação das prováveis fontes de infecção (ERSKINE *et al.*, 1993).

Tendo em vista o exposto e considerando que as indicações terapêuticas são na maioria das vezes realizadas de forma empírica (ANDRADE *et al.*, 2000) e que os testes de sensibilidade aos antimicrobianos são instrumentos muito úteis para avaliar o desenvolvimento de resistência em patógenos (BARBERIO *et al.*, 2002), idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de conhecer a sensibilidade “in vitro” frente alguns antibióticos e quimioterápicos das cepas de *S. aureus* isoladas no leite de vacas com mastite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 72 cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com sinais de mastite (COSTA *et al.*, 2000) ou que apresentavam positividade no California Mastitis Test (SCHALM; NOORLANDER, 1957), em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo.

As amostras de leite foram semeadas em ágar sangue desfibrinado de ovino a 5% (v/v) e incubadas em estufa a 37° C por 24 a 48h. *S. aureus* foram identificados por coloração pelo método de Gram, fermentação da glicose e manitol em aerobiose e anaerobiose, produção de pigmento em agar seletivo e ecas rpv as de acetoina, coagulase, termonuclease (T nase), segundo KLOSS; LAMBE (1991), VARNAM; EVANS (1991) e QUINN *et al.* (1994). As cepas a serem estudadas já isoladas e identificadas, foram incubadas em 2 mL de meio de caldo cérebro coração (BHI) e incubadas a 37° C por 24h.

Os testes de sensibilidade “in vitro” foram realizados pelo método de Kirby-Bauer conforme o recomendado pelo National Mastitis Council, sendo utilizados os seguintes antimicrobianos: penicilina (10 un), gentamicina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), vancomicina (30mcg), novobiocina (30mcg), oxacilina

Tabela 1 - Distribuição da sensibilidade “in vitro” das cepas de *S. aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo, frente aos antibióticos e quimioterápicos avaliados, 2002.

Antibióticos e quimioterápicos	Nº de cepas	%
Ampicilina	3	4,2
Eritromicina	70	98,6
Estreptomicina	68	94,4
Gentamicina	70	98,6
Novovobiocina	53	73,4
Oxacilina	61	84,7
Penicilina	2	2,8
Vancomicina	52	72,2
Total	72	100,0

(1 mcg), estreptomicina (10 mcg) e eritromicina (15 mcg).

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra a distribuição dos resultados dos testes de sensibilidade “in vitro” das cepas de *S. aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo, frente aos antibióticos e quimioterápicos avaliados. Observa-se que os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina (98,6%) e a eritromicina (98,6%) seguidos pela estreptomicina (94,4%), oxacilina (84,7%), novobiocina (73,4%), vancomicina (72,2%), ampicilina (4,2%) e a penicilina (2,8%). Verifica-se, também, que nenhum destes princípios ativos, agindo isoladamente, pode ser ativo contra qualquer das cepas experimentadas.

A Tabela 2 mostra distribuição da resistência “in vitro” das cepas de *S. aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite em 10 propriedades rurais do Estado de São Paulo, frente aos antibióticos e quimioterápicos estudados. Verifica-se que as 72 (100%) cepas testadas apresentaram resistência simultânea a pelo menos dois antibióticos e quimioterápicos.

Tabela 2 - Distribuição da resistência “in vitro” das cepas de *S. aureus* isoladas em amostras de leite de vacas com mastite em 10 propriedades rurais do Estado de S. Paulo, frente aos antibióticos e quimioterápicos avaliados, 2002.

Antibióticos e quimioterápicos	Nº de cepas	%
AMP + PEN	35	48,6
NOV + OXA	2	2,8
AMP + EST + PEN	2	2,8
AMP + NOV + PEN	7	9,7
AMP + OXA + PEN	2	2,8
AMP + VAN + PEN	10	13,9
AMP + EST + OXA + PEN	1	1,4
GEN + VAN + ERI + PEN	1	1,4
AMP + NOV + OXA + PEN	3	4,2
AMP + NOV + VAN + PEN	6	8,3
AMP + OXA + VAN + PEN	2	2,8
AMP + EST + NOV + OXA + VAN + PEN	1	1,4
Total	72	100,0

AMP = Ampicilina
 PEN = Penicilina
 NOV = Novobiocina
 OXA = Oxacilina
 VAN = Vancomicina
 EST = Estreptomicina
 GEN = Gentamicina

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A análise da Tabela 1 revela que a gentamicina foi o antibiótico que apresentou maior (98,6%) ação “in vitro” sobre os *S. aureus*, achado este que se aproxima dos obtidos por OLIVEIRA *et al.* (2002), NADER FILHO *et al.* (1986), VARGAS *et al.* (1996) e ANDRADE *et al.* (2000), cujos valores foram de 100%, 94,6%, 95,1% e 89,4%, respectivamente. Todavia, COSTA *et al.* (1996), LANGONI *et al.* (1991), DOMINGUES *et al.* (1994), COSTA *et al.* (2000) e FREITAS *et al.* (2005), obtiveram valores inferiores, quais sejam, 52,5%, 72,1%, 80%, 54% e 49%, respectivamente. Apesar dos distintos percentuais de sensibilidade a este princípio ativo, acredita-se que os resultados obtidos possam corroborar com a afirmação de LANGONI *et al.* (2000), segundo a qual a gentamicina continua sendo um antibiótico eficaz no tratamento das mastites bovinas de origem bacteriana. Por outro lado, observa-se que a eritromicina, a exemplo da gentamicina, foi o princípio ativo que apresentou a maior (98,6%) ação “in vitro” sobre os *S. aureus* isolados das mastites nas propriedades objeto desta investigação. Este achado foi superior aos verificados por NADER FILHO *et al.* (1986), FAGLIARI *et al.* (1990) e BARBERIO *et al.* (2002), cujos valores foram de 89,2%, 93,1% e 78,7%, respectivamente.

A análise da Tabela 1 mostra, ainda, que a penicilina foi o antibiótico que apresentou menor (2,8%) ação “in vitro” sobre os *S. aureus*, sendo este resultado inferior aos obtidos por COSTA *et al.* (1996), DOMINGUES *et al.* (1994), NADER FILHO *et al.* (1986), LANGONI *et al.* (1991), VARGAS *et al.* (1996), FREITAS *et al.* (2005) e ANDRADE *et al.* (2000) cujos valores foram de 6,8%, 10%, 13,5%, 13,7%, 18,1%, 20% e 23,7%, respectivamente. Segundo ANDRADE *et al.* (2000) a grande variação destes percentuais de sensibilidade “in vitro” talvez possa ser atribuída a utilização empírica e indiscriminada destes princípios ativos no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, de modo proporcionar o aparecimento de linhagens resistentes.

Os dados inseridos na Tabela 1, evidenciam, também que nenhum dos princípios ativos ensaiados, agindo isoladamente, pode ser ativo contra qualquer das cepas de *S. aureus* experimentadas. Tais achados parecem corroborar com a afirmação de NADER FILHO *et al.* (1986), segundo a qual o emprego de uma medicação que apresentasse apenas um dos antibióticos e quimioterápicos ensaiados, não eliminaria a totalidade das cepas de *S. aureus* isoladas nos casos de mastite bovina estudados na região objeto desta investigação.

Constitui-se motivo de grande preocupação a elevada (100%) ocorrência de cepas de *S. aureus* que apresentaram resistência múltipla frente aos princípios ativos ensaiados (Tabela 2), uma vez que muitos antibióticos e quimioterápicos disponíveis no merca-

do não teria efeito sobre tais microrganismos, fato este que poderia acarretar enorme dificuldade no tratamento dos animais doentes e, conseqüentemente, agravar as perdas econômicas decorrentes desta enfermidade.

A predominância (97,2%) de cepas resistentes simultaneamente à penicilina e à ampicilina verificada (Tabela 2), também foi observada por LANGE *et al.* (1997) no Rio Grande do Sul, RAIMUNDO *et al.* (1999) e PEREIRA (2001) em Minas Gerais, cujos valores foram de 85,3%, 100% e 92,8%, respectivamente. Acredita-se que tais achados possam ser atribuídos a provável capacidade de produção da beta-lactamase das cepas de *S. aureus* isoladas (ARCHER *et al.*, 1994), a freqüente utilização destes princípios ativos nas propriedades objeto desta investigação (FREITAS *et al.*, 2005) e ao uso inadequado destes medicamentos (FAGLIARI *et al.*, 1990; ANDRADE *et al.*, 2000).

Sabe-se, contudo, que o elevado custo dos exames laboratoriais tem inibido a realização do isolamento, identificação e dos testes de sensibilidade “in vitro” dos agentes etiológicos da mastite bovina (FREITAS *et al.*, 2005). Desse modo, na maioria das vezes, a escolha do medicamento anti-mastítico tem se baseado apenas no quadro clínico da enfermidade (FAGLIARI *et al.*, 1990). Diante destes fatos, prejuízos ainda maiores têm sido experimentados pelos produtores rurais em decorrência dos insucessos obtidos no tratamento da mastite bovina (FREITAS *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos oferecem valiosas informações sobre a sensibilidade dos *S. aureus* isolados nos casos de mastite bovina frente aos antimicrobianos testados. Todavia, deve-se assinalar que a escolha aleatória de medicamentos que possuam, por exemplo, a gentamicina como princípio ativo, não implicará necessariamente no sucesso do tratamento, especialmente naquelas propriedades onde seu uso é freqüente e inadequado.

Diante do exposto, conclui-se que para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento da mastite bovina causada por *S. aureus*, torna-se imperiosa a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antibióticos e quimioterápicos das cepas isoladas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M.A.; DIAS FILHO, F.C.; MESQUISTA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade “in vitro” de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira*, v.1, n.1, p.53-57, 2000.
- ARCHER, G.L.; NIEMEYER, D.M.; THANASSI, J.A.; PUCCI, M.J. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, v.38, n.3, p.447-454, 1994.

- BARBERIO, A.; GIETL, H.; DALVIT, P. "In vitro" sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e coliformes isolados de mastite bovina na região de Veneto, Itália, no período de 1996-1999. *Napgama*, v.5, n.1, p.10, 2002.
- BRABES, K.C.S.; CARVALHO, E.P.; DIONÍSIO, F.L.; PEREIRA, M.L.; GARINO, F.; COSTA, E.O. Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Napgama*, v.2, n.3, p.4-11, 1999.
- COSTA, E.O.; CARCIOFI, A.C.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.V.; VIANI, F.C.; MASCOLI, R.; LIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. *Hora Veterinária*, v.15, n.89, p.53-54, 1996.
- COSTA, E.O.; RAIA, M.R.; WATANABE, E.T.; GARINO, F.; COELHO, V. Influência do tratamento intramamário de casos de mastite de bovinos em lactação em relação à presença de resíduos de antibióticos no leite de quartos sadios. *Napgama*, v.3, n.4, 14-17, 2000.
- DOMINGUES, P.F.; PADOVANI, C.R.; DOMINGUES, L.R. Estudo da eficácia *in vitro* dos antibióticos e quimioterápicos usados no tratamento da mastite bovina por *Staphylococcus* sp. *Hora Veterinária*, n.82, p.27-29, 1994.
- ERSKINE, R.J.; KIRK, J.H.; TYLER, J.W.; DEGRAVES, F.J. Advances in the therapy for mastitis. *Veterinary Clinics North America Food Animal Practice*, v.9, n.3, p.499-513, 1993.
- FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A.; FERREIRA NETO, J.M. Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite clínica e subclínica. *Ciência Veterinária*, v.4, n.2, p.11-13, 1990.
- FREITAS, M.F.L.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; STAMFORD, T.L.M.; RABELO, S.S.A.; SILVA, D.R.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SANTOS, F.G.B.; 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. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, 2005. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/ARQUIVOS/V72_2/freitas.PDF>. Acesso em: 20 abr. 2006.
- KLOSS, W.E.; LAMBE, JUNIOR, D.W. *Staphylococcus*. In: BALOWS, A. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 5.ed. Washington: Am. Soc. Microbiol., 1991. p.222-237.
- LANGE, C.; CARDOSO, M.; BANTA, C. Epidemiological characterization of *S. aureus* isolated from bovine mastitis in Porto Alegre, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v.28, p.215-219, 1997.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; PINTO, M.P.; LISTONI, F.J.P. Etiologia e sensibilidade bacteriana da mastite bovina subclínica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.43, n.6, p.507-515, 1991.
- LANGONI, H.; SILVA, A.V. DA; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina: flora bacteriana aeróbica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária*, v.20, p.204-209, 1998.
- LANGONI, H.; MENDONÇA, A.O.; DEVELLEY, A. Avaliação do uso da associação da bromexina com gentamicina no tratamento da mastite subclínica bovina. *Napgama*, n.1, p.4-7, 2000.
- NADER FILHO, A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; ROSSI JUNIOR, O.D.; AMARAL, L.A. Sensibilidade dos *Staphylococcus aureus* isolados em casos de mastite bovina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.38, n.4, p.581-588, 1986.
- NATIONAL MASTITIS COUNCIL (USA). *Laboratory and field handbook on bovine mastitis*. Madison: WI:NMC, 1987. 222p.
- OLIVEIRA, A.A.F.; MOTA, R.A.; SOUZA, M.I.; SÁ, M.E.P. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* frente a amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de mastite subclínica bovina, no Agreste meridional de Pernambuco. *Hora Veterinária*, v.22, n.127, p.8-10, 2002.
- PEREIRA, R.O. *Epidemiologia Molecular da Mastite causada por Staphylococcus aureus*. 2001. 52p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – Jaboticabal, 2001.
- RAIMUNDO, O.; DEIGHTON, M.; CAPSTIC, J.; GERRATY, N. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymorphisms of the coagulase gene. *Veterinary microbiology*, v.66, n.4, p.275-84, 1999.
- SÁ, M.E.P.; CUNHA, M.S.R.S.; ELIAS, A.O.; VICTORIA, C.; LANGONI, H. 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 Veterinary Research Animal Science*, v.41, n.5, p.321-326, 2004.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. *Clinical veterinary microbiology*. London: Wolfe, 1994. 648 p.
- SANTOS, F.G.B.; MOTA, R.A.; SILVEIRA FILHO, V.M.; SOUZA, H.M.; OLIVEIRA, M.B.M.; JOHNER, J.M.Q.; LEAL, N.A.; ALMEIDA, A.M.P.; LEAL-BALBINO, T.C. Tipagem molecular de *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Napgama*, v.6, n.1, p.19-23, 2003.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.130, p.199-204, 1957.
- VARGAS, A.C.; LAZZARINI, A.; DUTRA, V.; WEISS, L.H.N.; FERREIRA, G.L.; FLORES, L.A.S. Agentes infecciosos mais prevalentes em mastite bovina na região de Santa Maria, RS – Perfil de sensibilidade *in vitro*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. Anais. Goiânia: Sociedade Goiana de Medicina Veterinária, 1996. p.119.
- VARNAM, A.H.; EVANS, M.G., *Foodborne pathogens: an illustrated text*. London: Wolfe, 1991. 557p.

Recebido em 20/7/06

Aceito em 1/2/07