

# IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS DO LEITE DE VACAS COM MASTITE

Luciene Lignani Bitencourt<sup>1</sup>  
Marta Cristina Teixeira Leite<sup>1</sup>  
Eline Paula Figueira Cazaroti<sup>1</sup>  
Felipe Neres Botelho<sup>1</sup>  
Kássio Chiabai Giuberti<sup>1</sup>  
Vítor Bastos Pereira da Silva<sup>1</sup>

## RESUMO

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) destaca-se como o principal agente causador da mastite bovina. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença do *S. aureus* como agente etiológico da doença e avaliar seu perfil de sensibilidade antimicrobiana. Em razão disso, amostras de leite foram colhidas de quartos mamários positivos ao California Mastitis Test (CMT) para isolamento e identificação do *S. aureus*. Foram coletadas amostras dos insufladores dos conjuntos de ordenha e das mãos dos ordenhadores. Para avaliação do perfil de sensibilidade, 17 isolados foram submetidos a testes de antibiograma, utilizando-se a técnica de difusão em disco. *S. aureus* foi isolado e identificado em 83,4% das amostras de leite coletadas. O agente também foi isolado nas amostras obtidas das mãos dos ordenhadores e nos insufladores, observando-se o aumento de 71,1% na contaminação do equipamento entre início e final da ordenha. Verificou-se, também, que 100% dos estafilococos foram sensíveis aos seguintes antibióticos: novobiocina, sulfa + trimetropin, azitromicina, gentamicina, vancomicina, oxacilina, cefoxitina, tetraciclina e ciprofloxacina. Entretanto, foram observados níveis variados de resistência à penicilina, amoxicilina + ácido clavulônico, ampicilina, cefalexina, neomicina, estreptomomicina e eritromicina. Os resultados encontrados demonstraram elevada prevalência do *S. aureus* como principal agente causador de mastite no rebanho bovino avaliado e apontaram grande variação nos perfis de resistência aos antimicrobianos entre as cepas estudadas.

**Palavras-chave:** Antibióticos. Gado de leite. CMT. Prevalência. Resistência.

## IDENTIFICATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM BOVINE MASTITIC MILK

### ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) stands out as the major causative agent of bovine mastitis. The objective of this study was to determine the presence of *S. aureus* as the etiologic agent of the disease and evaluate its antimicrobial susceptibility profile. Milk samples were collected from the mammary quarters positive at California Mastitis Test (CMT) for the isolation and identification of *S. aureus*. Samples were also collected from blowers of the milking sets and the hands of milker. To assess the sensitivity profile, 17 isolates were subjected to antibiotic susceptibility testing, using the disk diffusion technique. *S. aureus* was isolated and identified in 83.4% of the collected milk samples. The agent was also isolated in samples taken from the hands of milkers and blowers, noting an increase of 71.1% in the contamination of the equipment between beginning and end of milking. It was found that 100% of the staphylococci were sensitive to novobiocin, trimethoprim sulfa +, azithromycin, gentamycin, vancomycin, oxacillin, ceftiofur, tetracycline and ciprofloxacin. However, varying levels of resistance were observed for penicillin, amoxicillin + clavulonic acid, ampicillin, cephalixin, neomycin, streptomycin and erythromycin. The results showed high prevalence of *S. aureus* as etiological agent of mastitis in the evaluated herd and pointed out wide variation in antimicrobial resistance patterns between the studied strains.

**Keywords:** Antibiotic. Bovine. CMT. Prevalence. Resistance.

### INTRODUÇÃO

A produção total de leite no Espírito Santo passou de 281 milhões de litros, em 2000, para 437 milhões, em 2010, correspondendo a um aumento de 59 milhões e apresentando uma taxa anual de crescimento de 1,5% (EMBRAPA, 2015). A produção de leite está distribuída em todo o estado, com tendência de maior concentração na Mesorregião Sul Espírito-Santense com 35,9% do leite produzido. A segunda região com maior produção é a Mesorregião Noroeste Espírito-Santense, com 22,4%, seguida pelas regiões Central Espírito-Santense, com 22,3% e Litoral Norte Espírito-Santense com 19,4% (PEDEAG, 2013). Apesar desse crescimento, poucos estudos na área de sanidade de rebanhos leiteiros têm sido desenvolvidos no estado.

A mastite, definida como uma inflamação da glândula mamária reduz a capacidade produtiva do animal e a qualidade do leite produzido, sendo considerada a doença que ocasiona os maiores prejuízos na atividade leiteira. Nesse sentido, *Staphylococcus aureus* é reconhecido como o

principal patógeno da mastite bovina e seus principais sítios de localização nos animais parecem ser os quartos infectados (PERES e ZAPPA, 2011).

A transmissão ocorre usualmente entre vacas durante a ordenha. Esse agente tem a capacidade de colonizar o epitélio dos tetos, principalmente se a pele estiver lesionada ou ressecada. Uma vez dentro da glândula mamária, o *S. aureus* segue um padrão longo de infecção, levando a um aumento significativo da contagem de células somáticas (CCS) e causando graves lesões, que irão reduzir a qualidade do leite e o potencial produtivo da glândula mamária (SANTOS et al., 2003).

Um dos fatores considerados para o controle das mastites é a resistência dos agentes etiológicos aos antimicrobianos. *S. aureus* de origem humana resistente à meticilina podem apresentar resistência, também, à penicilina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, cefalotina, cloranfenicol, sulfametoxazol, ciprofloxacina e clindamicina (TEIXEIRA et al., 1995). Dessa maneira, o conhecimento de padrões de resistência aos antimicrobianos pode ser fundamental para o desenvolvimento de métodos preventivos efetivos para o controle da doença e para a elaboração de estratégias de tratamento quando necessárias (SABOUR et al., 2004).

Além do prejuízo econômico, a mastite bovina também está relacionada à transmissão de zoonoses aos seres humanos, ao desencadeamento de reações alérgicas e aos efeitos tóxicos oriundos das alterações causadas pelo uso de antibióticos no controle da infecção, constituindo um risco potencial à saúde dos consumidores (CASSOLI et al., 2008). Apesar da prevalência do *S. aureus* no rebanho do Ifes Campus Itapina não ser conhecida, este patógeno é encontrado com frequência em estudos de campo, demonstrando a necessidade de se verificar sua participação na etiologia da mastite.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência do *S. aureus* nos animais com mastite bovina no rebanho do Ifes Campus Itapina e determinar o perfil de sensibilidade das cepas isoladas aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da doença.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Os animais utilizados no presente estudo pertenciam ao rebanho bovino do Ifes Campus Itapina – caracterizado predominantemente pela raça Holandesa – e foram ordenhados mecanicamente, duas vezes ao dia, em um sistema de circuito fechado. Durante o período experimental, foram realizadas oito coletas de amostras de leite, totalizando 672 amostras avaliadas. O rebanho possuía, em média,

21 vacas em lactação (mínimo de 17 e máximo de 26 animais), as quais foram submetidas ao teste CMT, considerando-se como reações positivas a partir de uma cruz (+).

Dos animais que apresentaram resultado positivo ao teste CMT, foram colhidas aproximadamente 10ml de leite em frascos estéreis após os seguintes procedimentos: limpeza dos tetos com solução de iodo (pré-dipping), secagem com toalha de papel descartável e desinfecção do óstio dos tetos com algodão ou gaze umedecida com álcool 70%, conforme procedimentos recomendados pelo National Mastitis Control (HARMON et al., 1990). O leite coletado para o exame microbiológico foi transportado em caixa de material isotérmico, com gelo reciclável, até o laboratório onde as amostras foram processadas.

As amostras coletadas foram semeadas em Ágar Baird Parker, enriquecido com gema de ovo e com telurito de potássio e incubadas a 37°C por 48 horas para isolamento do *S. aureus* (BRASIL, 2003). As colônias foram identificadas como *Staphylococcus aureus* de acordo com as seguintes características: colônias de cor negra, brilhantes, com zona de precipitação circundada por halo claro.

As colônias identificadas como *S. aureus* foram submetidas à coloração de Gram, à provas bioquímicas de produção de catalase e de coagulase livre e ao crescimento em ágar sal manitol para confirmação da identificação. Como controle positivo para os testes de coagulase e de catalase foi utilizada a linhagem *S. aureus* ATCC 25923.

Paralelamente à coleta de leite, com auxílio de swabs estéreis, colheram-se amostras dos insufladores dos conjuntos de ordenha antes do início, durante e ao final da ordenha e amostras das mãos dos ordenhadores para isolamento e identificação do *S. aureus*, conforme previamente descrito. Para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), foram procedidas diluições a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , semeando-se 0,1 ml de cada diluição em placa de Petri com meio de ágar-sangue ovino a 5%, espalhando-se por toda a superfície, com auxílio da alça de Drigalski estéril, com a contagem após 24 horas de incubação a 37°C. Ademais, dezessete cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com sinais de mastite clínica ou que apresentavam positividade no CMT foram submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro*.

Colônias recentes com morfologias semelhantes e identificadas pelas características morfotintoriais, foram colhidas com auxílio de uma alça de platina e transferidas para um tubo de ensaio contendo 4ml de solução fisiológica 9%, onde foram incubadas até atingir a turvação de 0,5 na escala de Mc Farland, com concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL.

Dez minutos após o ajuste de suspensão bacteriana, foi introduzida uma alça de platina comprimida contra a parede do tubo a fim de retirar o excesso do inóculo, e semeado de forma homogênea em três direções diferentes abrangendo toda a superfície da placa de Petri em meio ágar Müeller-Hinton.

Utilizando-se a técnica de difusão de discos padronizada pelo CLSI (2011), foram testados discos impregnados com os seguintes antibióticos: novobiocina (5 mcg), amoxicilina (3 mcg) + ácido clavulânico (30 mcg), sulfam (25 mcg) + trimetoprim (5 mcg), azitromicina (15 mcg), penicilina (10 mcg), gentamicina (10 mcg), vancomicina (30 mcg), oxacilina (25 mcg), neomicina (30 mcg), estreptomicina (10 mcg), ampicilina (10 mcg), cefoxitina (30 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), eritromicina (15 mcg), cefalexina (30 mcg) e tetraciclina (30 mcg) colocados equidistantes, com o auxílio de uma pinça estéril, e pressionados levemente na superfície do ágar para uniformizar o contato. As placas de Petri foram incubadas invertidas a 35°C por 18-24-36 horas, para o desenvolvimento da colônia. A leitura e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com o diâmetro do halo de inibição, o qual foi medido em milímetros com auxílio de uma régua na parte de trás da placa de Petri invertida.

O perfil de resistência e sensibilidade das cepas foi determinado comparando o diâmetro dos halos obtidos com as tabelas de referência para *S. aureus*, de acordo com o Manual para antibiograma-difusão em disco (LABORCLIN, 2011), e classificadas como sensível, intermediário ou resistente aos agentes microbianos testados.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Das 672 amostras de leite avaliadas no teste CMT, 351 (52,2%) foram consideradas positivas e 321 (47,8%), negativas. A porcentagem de animais positivos no CMT variou de 62,5% a 94,1% entre os meses analisados, evidenciando um alto índice de mastite subclínica nesse rebanho (Tabela 1), tal constatação advém da consideração do limite normal de ocorrência de até 15% do rebanho, dado proposto por Santos e Fonseca (2007). É imperativo ressaltar que a alta prevalência da mastite pode estar associada às más condições de higiene do ordenhador e do equipamento de ordenha, bem como dos tetos e úberes das vacas antes, durante e após a ordenha.

**Tabela 1** – Frequência de vacas com mastite subclínica no rebanho do Ifes Campus Itapina, no período de novembro de 2014 a julho de 2015.

Mês/ano	Total de animais	Animais com mastite subclínica		Animais negativos no CMT	
		N	%	N	%
Nov/14	26	24	92,3	2	7,7
Dez/14	22	20	90,9	2	9,1
Jan/15	18	14	77,7	4	22,3
Fev/15	23	21	91,3	2	8,7
Mar/15	18	15	83,3	3	16,7
Abr/15	17	16	94,1	1	5,9
Mai/15	20	17	85,0	3	15,0
Jul/15	24	15	62,5	9	37,5
Índice médio	21	18	84,7	3	15,3

A frequência de mastite subclínica observada também pode estar associada com a presença de *S. aureus*, visto que este agente etiológico foi isolado e identificado em 83,4% das amostras de leite coletadas. Resultado semelhante ao desse estudo foi encontrado por Souza et al. (2016) que, nas amostras positivas ao exame microbiológico, observaram 83,87% dos isolados identificados como *Staphylococcus*. Esses achados são condizentes com os descritos na literatura, pois vários trabalhos têm apontado *S. aureus* como um dos principais agentes causadores de mastite no Brasil (ANDRADE et al., 2000; GUILLOUX et al., 2008; ZANETTE et al., 2010). Ademais, 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 prevalência de *S. aureus*, como causador da mastite bovina, pode estar relacionada aos mecanismos de resistência, tais como a presença do biofilme associada à redução da susceptibilidade a antimicrobianos e ao baixo percentual de cura durante a lactação (MELO, 2012). Além disso, a associação da presença dessa bactéria aos 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. Também se pode sugerir que, no rebanho avaliado, não estão sendo realizadas medidas eficientes de controle da mastite bovina (SAEKI, 2011).

*S. aureus* foi também isolado nos insufladores da ordenhadeira mecânica antes, durante e após a ordenha, evidenciando um aumento de 71,1% na sua contaminação entre o início e o final da ordenha (Tabela 2). Esses dados demonstram que os insufladores da ordenhadeira podem constituir

uma importante via de contaminação e transmissão desse patógeno durante a obtenção do leite. Desse modo, a higiene e a desinfecção do equipamento de ordenha é uma importante medida para a redução do número de microrganismos no leite.

**Tabela 2** – Contaminação por *S. aureus* nos insufladores da ordenhadeira mecânica em diferentes momentos de amostragem.

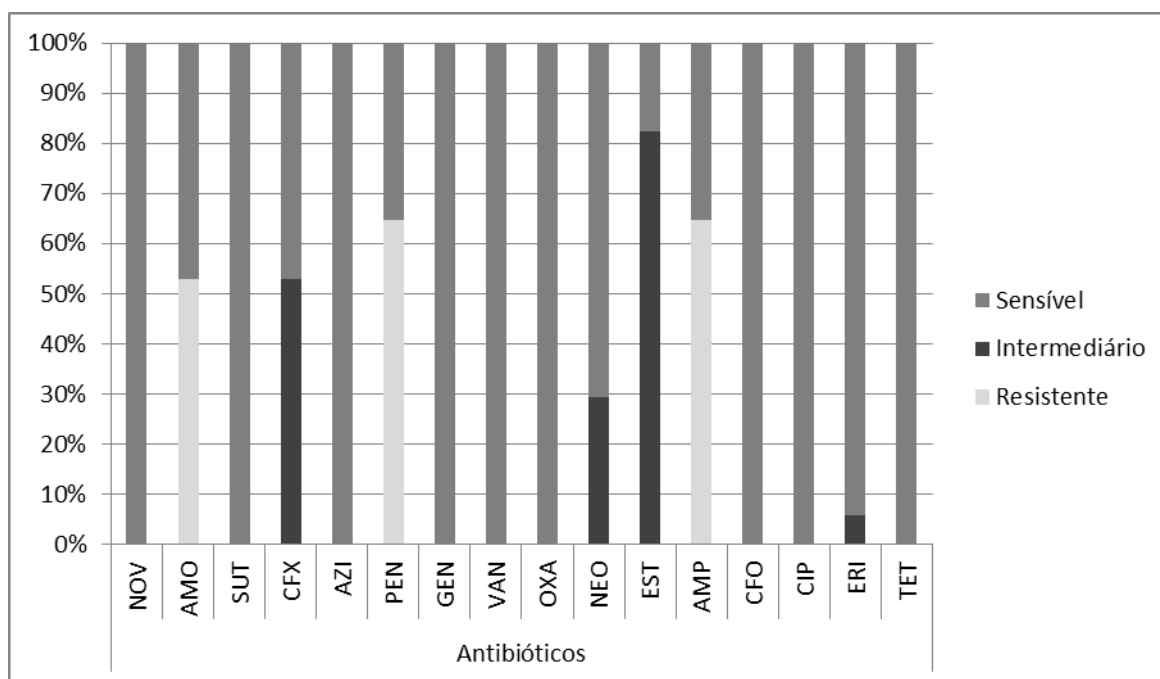
Momento de amostragem dos insufladores	UFC/ml
Antes da ordenha	$3,7 \times 10^3$
Durante a ordenha	$5,7 \times 10^3$
Final da ordenha	$6,5 \times 10^3$

Houve, ainda, isolamento de *S. aureus* nas mãos dos ordenhadores ( $1,5 \times 10^3$  UFC/ml). Embora a ordenha seja realizada mecanicamente no rebanho em questão, esse achado demonstra a importância da higienização das mãos, diante da possibilidade de constituírem-se em uma importante via de contaminação e transmissão do microrganismo durante o processo de obtenção do leite. Ademais, verificou-se que apesar de medidas preventivas evitarem a disseminação 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 os humanos, são fatores que contribuem para a manutenção da doença no rebanho (ZANETTE et al., 2010).

Em relação à suscetibilidade aos antimicrobianos, foram encontrados os percentuais gerais de 74,5%, 14,1% e 11,4%, respectivamente para sensibilidade, resistência e sensibilidade intermediária para as cepas analisadas. O perfil de sensibilidade das 17 cepas de *S. aureus* avaliadas neste estudo foi compilado na figura 1. Não foi observada resistência dos isolados da bactéria estudada frente aos antibióticos novobiocina, sulfa + trimetropin, azitromicina, gentamicina, vancomicina, oxacilina, cefoxitina, ciprofloxacina e tetraciclina, fato que indica que estes antimicrobianos podem ser uma opção para o tratamento de mastite no rebanho amostrado. Já para os antibióticos cefalexina, neomicina e estreptomicina foram observadas níveis intermediários de resistência.

Os maiores índices de resistência foram observados para penicilina (70,6%), amoxicilina + ácido clavulônico (58,55) e ampicilina (64,7%). Resultados semelhantes foram encontrados por Moroni et al. (2006), com 69,1%, 100% e 98,5% de cepas resistentes à penicilina, à amoxicilina e à ampicilina, respectivamente. Acredita-se que tais achados possam ser atribuídos a provável capacidade de produção de beta-lactamase das cepas de *S. aureus* isoladas (MORONI et al., 2006). Sobre isso, cabe elucidar que a produção de enzimas beta-lactamases tem sido relatada como um importante

mecanismo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos – a título de exemplo, cita-se a penicilina, a amoxicilina e a ampicilina – hidrolisando o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, perdendo, assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999). Além disso, a frequente utilização desses princípios ativos no rebanho analisado e o uso inadequado desses medicamentos, como, por exemplo, aplicação em subdosagens e períodos insuficientes de tratamento dos animais, também poderiam explicar esses resultados.



**Figura 1** – Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* do *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite. NOV = novobiocina; AMO = amoxicilina + ácido clavulânico; SUT = sulfa + trimetropin; CFX = cefalexina; AZI = azitromicina; PEN = penicilina; GEN = gentamicina; VAN = vancomicina; OXA = oxacilina; NEO = neomicina; EST = estreptomicina; AMP = ampicilina; CFO = cefoxitina; CIP = ciprofloxacina; ERI = eritromicina; TET = tetraciclina.

## CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho demonstram elevada prevalência do *Staphylococcus aureus* como agente causador de mastite no rebanho bovino do Ifes Campus Itapina e explicitam que essa incidência pode estar associada às más condições de higiene do ordenhador e do equipamento de ordenha, bem como dos tetos e dos úberes das vacas. Dessa forma, a correção dos procedimentos de higiene e de manejo de ordenha é uma importante medida para redução dos casos de mastite no rebanho.

Houve uma grande variação nos perfis de resistência aos antimicrobianos entre as cepas de *S. aureus* estudadas, sendo que penicilina, amoxicilina e ampicilina foram as bases antimicrobianas que



apresentaram maior índice de resistência frente às bactérias isoladas do leite de vacas com mastite no rebanho estudado. Isso salienta a necessidade da aplicação de testes de susceptibilidade para a escolha dos antimicrobianos mais adequados para o tratamento ou para a prevenção de mastite causada por *S. aureus*, reduzindo, assim, perdas na produção de leite, minimizando falhas terapêuticas e impedindo o aparecimento de cepas resistentes.

## 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n° 62**, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análise Microbiológica para Controle Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 2003.
- CASSOLI, D.C. et al. Diagnóstico da qualidade do leite na região sudoeste entre 2005 e 2008. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE, 3., 2008. Pernambuco. **Anais...** Recife: Editora CCS, 2008. p.08-10
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First informational Supplement**. CLSI document M100-S21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011
- EMBRAPA GADO DE LEITE. **Estatísticas do leite**. Coronel Pacheco, MG. Disponível em <<http://www.cnppl.embrapa.br>>. Acesso em: 28 set. 2015.
- GUILLOUX, A.G.A. et al. 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. et al. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990.
- LABORCLIN. **Manual para antibiograma-difusão em disco**. São Paulo, SP, 2011. Disponível em <[http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf\\_190.pdf](http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2015.
- PERES NETO, F.; ZAPPA, V. Mastite em vacas leiteiras. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Graça, n.16, p.1-28, 2011.
- INCAPER. PEDEAG – **Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura Capixaba**, Vitória, ES, 2013. Disponível em <<http://www.incaper.es.gov.br/pedeag/setores12.htm>>. Acesso em: 30 set. 2015.
- MELO, P.C. et al. Análise fenotípica e molecular da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos de mastite subclínica bovina. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.28, n.1, p.94-99, 2012.
- MORONI, P. et al. Short Communication: antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis in Italy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.89, p.2973–2976, 2006.

SABOUR, P.M. et al. Molecular typing and distribution of *Staphylococcus aureus* isolates in Eastern Canadian dairy herds. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, n.8, v.42, p.3449-3455, 2004.

SAEKI, E.K. et al. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, Brasília, v.5, n.3, p.284-290, 2011.

SANTOS, F.G.B. et al. Tipagem molecular de *S. aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, São Paulo, v.6, n.1, p.19-23, 2003.

SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F. **Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite**. Barueri: Editora Malone, 2007.

SOUZA, K.S.S et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, Belo Horizonte, v.8, n.2, p.83-89, 2016.

TEIXEIRA, L.A. et al. Geographic spread of epidemic multiresistant *Staphylococcus* spp. clone in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p.2400-2402, 1995.

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Iowa, v.12, p.3-7, 1999.

ZANETTE, E. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. **Unoesc & Ciência**, Joaçaba, v.1, n.1, p.65-70, 2010.