



Print version ISSN 1981 – 2965

Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal, 2014 Setembro; 8 (5 Supl 1): 366-378

<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140086>

051. Isolamento e identificação de *Staphylococcus aureus* resistentes à antimicrobianos em amostras de leite bubalino

Isolation and identification of antimicrobial resistant Staphylococcus aureus isolated from buffalo milk samples

Camila Chioda de Almeida¹; Lucas José Luduverio Pizauro¹; Oswaldo Durival Rossi Junior¹; Fernando Antônio de Ávila¹; Luiz Francisco Zafalon²; João Martins Pizauro¹

Resumo: A produção brasileira de leite de búfala e de seus derivados vêm crescendo anualmente devido às suas características peculiares. O gênero *Staphylococcus* destaca-se por ser causador da mastite contagiosa e de difícil tratamento devido à resistência aos antimicrobianos. Neste estudo foram colhidas 160 amostras de leite de búfala de uma propriedade localizada no município de Analândia, Estado de São Paulo. Nenhuma búfala apresentou sinais clínicos de mastite, 32 quartos mamários apresentaram mastite subclínica com reação positiva ao CMT. Foram isoladas 22 estirpes de *Staphylococcus aureus* (13,7%). As estirpes demonstraram sensibilidade à cloranfenicol (100%), rifampicina (100%), cefepime(100%), oxacilina(100%), ciprofloxacina, gentamicina(100%), tetraciclina (100%) clindamicina (96,9%), vancomicina (96,9%), (96,9%), cotrimoxazol (93,8%) e, entretanto demonstraram resistência à penicilina (31,3%) e eritromicina (43,8%) e uma estirpe apresentou-se multirresistente. Estes resultados reforçam que assim como nos bovinos, os bubalinos necessitam de um rígido programa de controle sanitário, principalmente da mastite.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, mastite bubalina, resistência à antimicrobiano

Abstract: The Brazilian production of buffalo milk and its derivatives is increasing annually due to its peculiar characteristics, which exceed those of cow milk. The *Staphylococcus* genre stands out for being the cause of contagious mastitis and the difficult to treat due to antimicrobial resistance. In this study, 160 samples of buffalo milk from a farm located in Analândia, São Paulo State, were collected. No buffalo demonstrated clinical mastitis, subclinical mastitis were detected in 32 with positive reaction to CMT. Twenty-two strains of *Staphylococcus aureus* (13.7%) were isolated. The strains demonstrated susceptibility to clindamycin (96.9%), vancomycin (96.9%), chloramphenicol (100%), rifampicin (100%), cefepime (100%), oxacillin (100%), ciprofloxacin (96.9 %), gentamicin (100%), cotrimoxazole (93.8%) and tetracycline (100%), but were resistant to penicillin (31.3%), and erythromycin (43.8%) and one stain demonstrated multiresistant. These results reinforce that as in bovine, buffaloes require a rigid program of sanitary control, especially for mastitis.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, bubaline mastitis, antimicrobial resistance

¹ Parte da dissertação do segundo autor, PPGCA, Universidade Federal de Mato Grosso;

² Estudante de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso;

³ Doutorando do PPGCA, Universidade Federal de Mato Grosso;

⁴ Esudantes de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso.

Introdução

A produção brasileira de leite de búfala e de seus derivados vêm crescendo anualmente. Assim como os bovinos, os bubalinos também podem apresentar mastite, diminuindo a produção e alterando a composição do leite (Hamza; Choudhuri, 1994). O gênero *Staphylococcus* destaca-se por serem estes microrganismos causadores de mastite contagiosa e de difícil tratamento (Szweda et al. 2012). Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento da mastite por *Staphylococcus aureus* são os β -lactâmicos e o seu uso indevido tem contribuído para o aumento de mecanismos de resistência, incluindo a baixa afinidade da proteína de ligação à penicila (PBP2a) (Memon et al. 2013). Nesta pesquisa foi analisada a frequência de isolamento de *S aureus* em relação ao teste do *California Mastitis Test* – CMT, Contagem de Células Somáticas – CCS e a frequência de sensibilidade a alguns antimicrobianos.

Materiais e Métodos

Foram coletadas 160 amostras provenientes de 40 búfalas de uma propriedade localizada no município de Analândia, Estado de São Paulo. Após a inspeção da glândula mamária, foi realizada prova da caneca telada de fundo escuro e *California Mastitis Test* – CMT

(Schalm & Noorlander, 1957). As amostras de leite foram colhidas após realizada assepsia dos tetos. A identificação de *Staphylococcus* spp foi realizada de acordo com Lancette & Bennett (2001). Outros microrganismos foram identificados segundo protocolo do Nacional Mastitis Concil (NMC, 1999). A confirmação de *S. aureus* foi realizada pela presença do gene *sa442* (Martineau et al. 1998). A contagem de células somáticas (CCS) foi obtidas por citometria de fluxo utilizando matriz bovina de acordo com o International Dairly Federation (IDF, 2006) realizados pela Clínica do leite ESALQ-USP. A produção de biofilme foi investigada por cultivo em Agar Vermelho Congo e teste de Microplaca. A análise da correlação entre isolamento de *S.aureus* e a variação na contagem de células somáticas foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis (Triola, 2008) dados foram analisados utilizando-se programa Estatístico R (versão 3.1).

Resultados e Discussão

Das 160 amostras de leite obtidas de 40 búfalas entre 2013 e 2014 obtidas de uma propriedade rural localizada no município de Analândia, nenhuma apresentou sinais clínicos de mastite, 32 apresentaram mastite subclínica com reação positiva ao CMT. Foram isoladas 22 estirpes de *S. aureus* representando uma

frequência de 13,7%, resultados semelhantes foram encontrados por El-Jakeen et al. (2013) 15% e El-Jakeen et al. (2010) 19,1%.

O isolamento de *S. aureus* em amostras de leite não reativas ao CMT correspondeu a 68,2% (Tabela 1), segundo

estudos de Kapronezai et al. (2005), que também observaram alta frequência de quartos negativos ao CMT com isolamento microbiológico, em bubalinos esses resultados levam a crer que a frequência de animais portadores no rebanho é alta (Tabela 1).

Tabela 1. Relação entre a reação ao teste do *California Mastitis Test* (CMT) e o isolamento de *S. aureus* em amostras de leite bubalino.

Reação ao CMT	Isolamento de <i>S.aureus</i>
Positivo	7 (31,8%)
Negativo	15 (68,2%)
Total	22 (100%)

A média da CCS de quartos com isolamento de *S. aureus* foi significativa superior a de quartos sem isolamento (Tabela 2). Kapronezai et al. (2005) relatou valores de mediana para CCS de 8.500/ml, quando foram isolados *Staphylococcus*, em bubalinos. Em um

estudo de Carvalho et al. (2007) amostras obtidas de leite com médias de CCS variando de 12.840/ml a 149.680/ml apresentaram infecção por diversos patógenos da mastite dentre eles o *S. aureus*.

Tabela 2. Relação da média da contagem de células somáticas e a frequência de isolamento de *S. aureus* obtidos de amostra de leite bubalino.

Isolamento	CCS (células/mL)	Frequência
+	422.727±581.546 ^A	22
-	166.912±267.041 ^B	58

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Kruskal Wallis (P>0,05)

As estirpes de *S. aureus* obtidas no estudo demonstram sensibilidade a Clindamicina (96,9%), Vancomicina (96,9%), cloranfenicol (100%), rifampicina (100%), cefepime(100%), oxacilina(100%), , ciprofloxacina (96,9%), gentamicina(100%), cotrimoxazol (93,8%) e tetraciclina (100%), entretanto demonstraram resistência a penicilina (31,3%), e a eritromicina (43,8%) (Tabela 3). Somente uma estirpe demonstrou multirresistência à três antimicrobianos simultaneamente (eritromicina, penicilina e cotrimoxazol). Memon et al. (2013) relataram a presença de 100% de isolados de *S.aureus* multirresistentes em amostras de leite bovino na China, Medeiros et al. (2011) encontraram amostras de *Staphylococcus* com 71,8% de resistência à penicilina, 65,8% oxacilina 58,7% eritromicina, 35,1% a gentamicina. 35,1% ao cotrimoxazol em rebanhos brasileiros. Khudaier et al. (2014) observaram *S.aureus* isolados de leite bubalino

apresentando 37,5% de resistência ao cloranfenicol, 100% de resistência a oxacilina, 100% de sensibilidade a gentamicina e 75% de sensibilidade à vancomicina. Embora Medeiros et al. (2011) sugerirem que exista uma disseminação de mecanismos associados a resistência antimicrobiana entre *Staphylococcus* em rebanhos bubalinos no Brasil, neste estudo entretanto demonstrou-se baixa resistência aos antimicrobianos utilizados, com exceção da penicilina e da eritromicina, o que condiz com as sugestões de Queiroz et al. (2012) de que a aquisição de resistência/multirresistência está relacionada ao uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos, sendo assim intimamente relacionado com um bom programa sanitário na propriedade. A resistência a penicilina e a eritromicina pode estar relacionada a estes serem os fármacos de eleição em casos de enfermidades nos animais.

Tabela 3. Resistencia e sensibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* isolados de amostras de leite bubalino.

Antibiótico	Resistencia	Sensibilidade
Cefepime	0,00	100%
Cloranfenicol	0,00	100%
Gentamicina	0,00	100%
Oxacilina	0,00	100%

Rifampicina	0,00	100%
Tetraciclina	0,00	100%
Ciprofloxacina	3,13	96,9%
Clindamicina	3,13	96,9%
Vancomicina	3,13	96,9%
Cotrimoxazol	6,25	93,8%
Penicilina	31,3	68,8%
Eritromicina	43,8	56,3%

Conclusões

Devido à positividade do exame microbiológico, mesmo nas amostras em teste do CMT negativo é preocupante, pois mostra que há veiculação do *S. aureus* no rebanho. O relato de multirresistência de estirpe de *S. aureus* à três antimicrobianos simultaneamente é preocupante, pois a persistência deste microrganismo dificulta o tratamento da doença e contribui para disseminação de estirpes resistentes. Estes resultados reforçam que assim como nos bovinos, os bubalinos necessitam de um rígido programa de controle sanitário, principalmente da mastite.

Referências Bibliográficas

CARVALHO, L.B.; AMARAL, F.R.; BRITO, M.A.V.P. et al. Contagem de células somáticas e isolamento de agentes causadores de mastite em búfalas (*Bubalus bubalis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 242-245, 2007.

EL-JAKEE, J.K.A.H.; ZAKI, E.R.; FARAG, R.S. Properties of enterotoxigenic *S. aureus* isolated from mastitic cattle and buffaloes in Egypt. **Journal of American Science**, v. 6, n. 11, p. 170-178, 2010.

EL-JAKEE, J.K.; AREF, N.E.; GOMAA, A.; EL-HARIRI, M. D.; GALAL, H. M.; OMAR, S. A.; SAMIR, A. Emerging of Coagulase Negative Staphylococci as a cause of mastitis in dairy animals: An environmental hazard. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1, p.74-78, 2013.

HAMZA, P.A.; CHOUDHURI, P.C. Chemoprophylactic studies on mastitis in buffaloes. **Indian. J. Dairy. Sci.**, v.47, p.723-726, 1994.

IDF - International Dairy Federation. Milk: enumeration of somatic cell. Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters. Brussels: IDF, 2006. 13p. (IDF Standard 148-2).

KAPRONEZAI, J.; MELVILLE, P.; BENITES, N.R. Análise microbiológica, teste de Tamis e California Mastitis Test realizados em amostras de leite de fêmeas bubalinas pertencentes a rebanhos do estado de São Paulo. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 183-187, 2005.

KHUDAIER, B.Y.; ANAD, I.T.; ABBAS, B.A. Isolation of *Staphylococcus aureus* from buffalo milk in Basra Governorate and detection of their antibiotic susceptibility, **Basra Journal Veterinary Res.**, v. 1, n. 1, 2014.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. Pages 387–403 in Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 2001, Downes, F. P. and Ito, K. ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC.

MARTINEAU, F.; PICARD, F.J.; ROY, H.P.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Species-specific and ubiquitous DNA based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology.**, Washington, v.36, n.3, p.617-623, 1998.

MEDEIROS, E.S.; FRANÇA, C.A.; KREWER, C.C.; PEIXOTO, R.M.; SOUZA JÚNIOR, A.F.; CAVALCANTI, M.B.; COSTA, M.M.; MOTA, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 793-796, 2011.

MEMON, J.; YANG, Y.; KASHIF, J.; YAQOUB, M.; BURIRO, R.; SOOMRO, J.; LIPING, W.; HONGJIE, F. Genotypes, virulence factors and antimicrobial resistance

genes of *Staphylococcus aureus* isolated in bovine subclinical mastitis from eastern China. **Pakistan Veterinary Journal**, Paquistão, v. 33, n. 4, p. 486-491, 2013.

NMC - Laboratory handbook on bovine mastitis. Madison, WI: National Mastitis Council, 1999. p. 171-173.

QUEIROZ, G.M.; SILVA, L.M.; PETRO, R.C.L.; SALGADO, H.R.N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 132-138 2012.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, p. 199-204, 1957.

SZWEDA, P.; SCHIELMANN, M.; MILEWSKI, S.; FRANKOWSKA, A.; JAKUBCZAK, A. Biofilm Production and Presence of *ica* and *bap* Genes in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Cows with Mastitis in the Eastern Poland. **Poland Journal Microbiology**. Polônia, v. 61, p. 65-69, 2012.

TRIOLA, M.F. Introdução à estatística. 10.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 696p.