

# **Sensibilidade Antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. Isolados de Bovinos, Bubalinos e Caprinos com Mastite**

Antimicrobial Sensibility of  
*Staphylococcus* spp. Isolated from  
Bovines, Buffalos and Goats with  
Mastitis

---

*Vinícius da Silva Amorim<sup>1</sup>; Josir Laine Aparecida  
Veschi<sup>2</sup>; Isamara Ferreira da Silva<sup>3</sup>; Danilo Sales  
Rosa<sup>4</sup>; Mateus Matiuuzzi da Costa<sup>5</sup>*

## **Resumo**

O trabalho objetivou avaliar a resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. de ruminantes (caprinos, bubalinos e bovinos) com mastite a alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pela presença do gene *Bla-Z* e produção de biofilme. O perfil de resistência dessas bactérias aos antibióticos ampicilina, penicilina G e oxacilina foi realizado pelo método de Kirby-Bauer. A produção do biofilme foi avaliada pela aderência em microplaca, e a presença do gene *blaZ* por PCR. Isolados de caprinos não foram resistentes a oxacilina, mas, 25% foram resistentes a penicilina e 25% a ampicilina. Nos isolados de bovinos, 23% apresentaram resistência à oxacilina, 67% à ampicilina e 64% à penicilina G. Em 46% dos isolados de bubalinos, observou-

---

<sup>1</sup>Estudante de Medicina Veterinária, bolsista IC/CAPES.

<sup>2</sup>Médica-veterinária, D.Sc. em Medicina Veterinária Preventiva, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, josir.veschi@embrapa.br.;

<sup>3</sup>Médica-veterinária, mestranda da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf).

<sup>4</sup>Estudante de Biologia, bolsista IC/CNPq.

<sup>5</sup>Médico-veterinário, D.Sc. em Biologia Celular e Molecular, professor da Univasf, Petrolina, PE, mateus.costa@univasf.edu.br.

se resistência à oxacilina, 15% à ampicilina e 46% à penicilina G. Cinquenta por cento dos isolados de caprinos, 97% dos isolados de bovinos e 30% dos isolados de bubalinos, possuem o gene de resistência *Bla-Z*. Todos os isolados produziram biofilme. Oxacilina ainda é alternativa para terapia de mastite caprina, porém, nas mastites bovinas e bubalinas é indicado o uso consciente deste fármaco, a fim de que não haja aumento da resistência nos isolados de *Staphylococcus* spp. O mesmo uso consciente deve ser feito para ampicilina e penicilina G.

**Palavras-chave:** antibióticos, ruminantes, beta-lactâmicos, resistência.

## Introdução

A mastite é uma enfermidade de grande importância, por causar várias perdas na produção dos rebanhos leiteiros. Essa doença afeta a quantidade e qualidade do leite produzido, bem como a capacidade da glândula mamária em secretar o leite. Essa doença possui tratamento de custo elevado por causa da utilização de antibióticos. O leite contaminado proveniente de animais doentes deve ser descartado (DHAKAI et al., 2007; GERNAND et al., 2012). A doença é caracterizada por uma inflamação das glândulas mamárias, geralmente causada por agentes infecciosos, podendo ser classificada em mastite clínica ou subclínica.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são isoladas com maior frequência nos casos de infecções intramamárias em ruminantes (GODDEN et al., 2002). A ocorrência de cepas resistentes dessa bactéria aos antibióticos gera um impasse no tratamento da mastite (GONI et al., 2004; HARBOTTLE et al., 2006). A presença de genes de resistência permite que essas bactérias sintetizem enzimas capazes de degradar ou alterar os locais de ação dos antibióticos ou, ainda, fazer com que elas usem uma rota metabólica diferente, que contorne a ação desses fármacos (TENOVER; MCGOWAN JÚNIOR, 2008).

Genes relacionados à resistência dessas bactérias a antibióticos são estudados, como exemplo o gene *Bla-Z* (COELHO et al., 2007; MIMICA; MENDES, 2007). Esse gene confere ampla resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos levando a expressão da enzima  $\beta$ -lactamase, que hidrolisa o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas (LI et al., 2007).

A produção de biofilme é outro fator de importância na infecção bacteriana persistente ou crônica (XUE et al., 2014). O biofilme trata-se do aglomerado formado pelas bactérias, que estão envolvidas por uma matriz de polímeros orgânicos, que ficam aderidos a uma superfície (COSTERTON et al., 1999) protegendo os microrganismos contra antibióticos e contra as defesas do hospedeiro com a fagocitose (ARCIOLA et al., 2001).

Objetivou-se identificar nos isolados de *Staphylococcus* spp. de ruminantes (bovinos, caprinos e bubalinos), a resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e sua relação com a presença do gene *Bla-Z* e a produção de biofilme.

## Material e Métodos

Foram avaliadas 60 cepas de *Staphylococcus* obtidas da bacterioteca do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf), Petrolina, PE, previamente isolados de ruminantes (39 de bovinos, sete de caprinos e 14 de bubalinos) com mastite. Os isolados já haviam sido caracterizados por meio de PCR para o gene *BlaZ*. Os testes de sensibilidade in vitro foram realizados pelo método de difusão em disco Kirby-Bauer (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2006). Os discos foram impregnados com os antibióticos Ampicilina (10  $\mu$ g), Penicilina G (10  $\mu$ g) e Oxacilina (10  $\mu$ g), para avaliar se eram resistentes (R) ou sensíveis (S) aos antimicrobianos.

A produção de biofilme foi analisada pelo método de aderência em microplacas segundo Merino et al. (2009). A absorbância foi determinada em 620 nm (leitor de Elisa). Os isolados foram testados em triplicata, e cepas foram utilizadas como controle positivo e negativo. Poços não inoculados contendo TSB (*Tryptone Soya Broth*) e glicose serviram como teste em branco.

## Resultados e Discussão

Houve variação no perfil de resistência para cada espécie analisada (Tabela 1). Os isolados de *Staphylococcus* spp. de caprinos não apresentaram resistência à oxacilina, e baixa resistência (25%) para penicilina e ampicilina. Metade dos isolados (50%) provenientes de caprinos apresentou o gene de resistência *Bla-Z*, que, quando ativo, confere resistência aos  $\mu$ -lactâmicos.

Nos isolados de bovinos, houve baixa resistência para oxacilina (23%), e uma maior resistência para ampicilina (67%) e penicilina (64%). Nestes isolados, o gene *Bla-Z* foi encontrado amplamente disseminado (97%), confirmando os resultados da caracterização fenotípica da resistência. Nos isolados obtidos de bubalinos, ocorreu baixa resistência à ampicilina (15%) e valores maiores para oxacilina e penicilina (ambos apresentaram 46%). Nestes, também, houve uma menor detecção do gene *Bla-Z*.

**Tabela 1.** Perfil de resistência a antibióticos em *Staphylococcus* spp. isolados de caprinos, bovinos e bubalinos com mastite, presença do gene *Bla-Z* e produção de biofilme por espécie (caprina, bovina, bubalina).

Espécie	Resistência aos antibióticos			Gene- <i>blaZ</i>	Produção de biofilme		Número de animais
	Oxacilina	Ampicilina	Penicilina		Moderada	Forte	
Caprina	0%	25%	25%	50%	100%	0%	7
Bovina	23%	67%	64%	97%	53%	47%	39
Bubalina	46%	15%	46%	30%	38%	62%	14

Dados expressos em porcentagem em relação ao número de animais.

A resistência aos beta-lactâmicos pode ser justificada pela presença do gene *Bla-Z*, que codifica enzimas que degradam o anel beta-lactâmico da droga, inativando sua ação (MEDEIROS et al., 2011), pela síntese do biofilme que leva a uma baixa difusão dos antimicrobianos na matriz e a baixa atividade metabólica das bactérias dentro dos biofilmes (MELO, 2008). Vários autores relacionam que a resistência das bactérias aos antibióticos pode ser causada pelo uso indiscriminado, bem como em subdosagem (COSTA et al., 2013; GARINO JÚNIOR et al., 2011) e pelo emprego de metodologias diferentes no uso desses medicamentos (AIRES-DE-SOUSA et al., 2007).

A produção de biofilme foi observada em todos os isolados, independente da resistência ou da sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados. Os biofilmes são associados com a maior resistência aos antimicrobianos, bem como com a aderência e virulência de isolados de *Staphylococcus* spp. no leite ou no desenvolvimento de mastites (FABRES-KLEIN et al., 2015).

## Conclusão

A oxacilina ainda é uma alternativa para terapia da mastite caprina, porém, nas mastites bovinas e bubalinas é indicado o uso consciente deste fármaco, na tentativa de diminuir a resistência de isolados de *Staphylococcus* spp. nestas espécies de ruminantes. A ampicilina e a penicilina G devem ter seu uso racional nas três espécies de animais pesquisadas.

## Referências

- AIRES-DE-SOUSA, M.; PARENTE, C. E.; VIEIRA-DA-MOTTA, O.; BONNA, I. C.; SILVA, D. A.; LENCASTRE, H. de Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from buffalo, bovine, ovine, and caprine milk samples collected in Rio de Janeiro State, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, n.12, p. 3845-3849, 2007.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 39, p. 2151-2156, 2001.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standards. Wayne: Pennsylvania, 2006. 88 p. (CLSI. Document M7-A7).
- COELHO, S. M. O.; MORAES, R. A. M.; SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; GOMES, L. P.; SOUZA, M. M. S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de humanas e animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 195-200, 2007.
- COSTA, G. M. D.; BARROS, R. A.; CUSTÓDIO, D. A. D. C.; PEREIRA, U. D. P.; FIGUEIREDO, D. J.; SILVA, N. D. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in dairy herds from the state of Minas Gerais, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: common cause of persistent infections. **Sciences**, New York, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- DHAKAL, I. P.; DHAKAL, P.; KOSHIHARA, T.; NAGAHATA, H. Epidemiological and bacteriological survey of buffalo mastitis in Nepal. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 69, p. 1241-1245, 2007.
- FABRES-KLEIN, M. H.; SANTOS, M. J. C.; KLEIN, R. C.; SOUZA, G. N. de; RIBON, A. D. O. B. An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. **BMC Veterinary Research**, London, v. 11, n. 1, p. 1, 2015.

GARINO JÚNIOR, F.; CAMBOIM, E. K. A.; NEVES, P. B. das; SÁ, A.V.V. de; ALMEIDA, A. P. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no Semiárido paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n.1, p.103-107, 2011.

GERNAND, E.; REHBEIN, P.; BORSTEL, U. U. von; KÖNIG, S. Incidences of and genetic parameters for mastitis, claw disorders, and common health traits recorded in dairy cattle contract herds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, p. 2144-2156, 2012.

GODDEN, S. M.; JANSEN J. T.; LESLIE, K. E.; SMART N. L.; KELTON, D. F. The effect of sampling time and sample handling on the detection of *Staphylococcus aureus* in milk from quarters with subclinical mastitis. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 43, p. 38-42, 2002.

GONI, P., VERGARA Y., RUIZ J., ALBIZU I., VILA J., GOMEZ-LUS R. Antibiotic resistance and epidemiological typing of *S. aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 23, n. 3, p. 268-272, 2004.

HARBOTTLE, H.; THAKURA, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. **Animal Biotechnology**, New York, v.17, n. 2, p.111-124, 2006.

LI, X. Z.; MEHROTRA, M.; GHIMIRE, S.; ADEWOYE, L. -lactam resistance and beta-lactamases bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 121, n. 3/4, p. 197-214, 2007.

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

MELO, P. C. **Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados dos casos de mastite subclínica bovina.** 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGARAIRIGARAY, M.; VALLE, J.; SOLANO, C.; CALVO, E.; LOPEZ, J.A.; FOSTER, T.J.; PENADÉS, J.R.; LASA, I. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*, **J. Bacteriology**, v.191, n.3, p. 832-843, 2009.

MIMICA, M.J.; MENDES, C.M.F. Diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *Staphylococcus aureus*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, p.43, v.6, p.399-406, 2007.

TENOVER, F.C.; MCGOWAN JÚNIOR. J. E. Antimicrobial resistance. **International Encyclopedia of Public Health**, [Oxford], p. 211-219, 2008.

XUE, T.; CHEN, M; Shang, F. Short communication: effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**, [Oxford], v. 97, p. 6.129-6.134, 2014.