

Susceptibilidade a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite¹

Thais Cristina de Assis Oliveira², Isabela Fagundes Evangelista³, Ketina Andréa Müller⁴, Renata de Freitas Mendes⁵, Carla Christine Lange⁶, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito^{6,7}

¹O presente trabalho foi realizado com o apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Parte do plano de ação "Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria e Pecuária (Embrapa, 01.15.02.001.07.03)", liderado por Maria A. V. P. Brito.

²Graduanda em Ciências Biológicas – CES/Juiz de Fora. Bolsista PIBIC do CNPq. E-mail: thais.cris.ld@gmail.com

³Graduanda em Ciências Biológicas – CES/Juiz de Fora. E-mail: isabela_jfnet@hotmail.com

⁴Graduanda em Medicina Veterinária – Unicruz/Cruz Alta. E-mail: ketina.andrea@hotmail.com

⁵Professor – CES/Juiz de Fora. E-mail: renatamendes@pucminas.cesjf.br

⁶Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. E-mail: carla.lange@embrapa.br; maria.brito@embrapa.br

⁷Orientador

Resumo: A resistência aos antimicrobianos é um assunto complexo e um sério problema de saúde pública. O uso de antimicrobianos em medicina veterinária e como promotores de crescimento e prevenção de doenças na agricultura e pecuária é muito intenso e estudos recentes confirmaram a transferência de genes de resistência do animal para o homem. *Staphylococcus aureus* é um patógeno responsável por toxi-infecções alimentares, comumente encontrado no leite e seus derivados. O objetivo do presente estudo foi estabelecer o fenótipo de resistência de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica. O fenótipo de resistência aos antimicrobianos foi avaliado pelo teste de difusão em ágar com discos de antibióticos, de acordo com as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute. Quarenta e dois por cento das estirpes foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados; 39% foram resistentes somente à penicilina e 12% foram resistentes à penicilina e tetraciclina, concomitantemente. Quatro estirpes apresentaram multirresistência e nenhuma estirpe analisada apresentou resistência à metecilina. O percentual de resistência à penicilina encontrado neste estudo foi semelhante ao relatado em outros estudos conduzidos com *S. aureus* de mastite bovina no Brasil. Adicionalmente foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das 21 estirpes que apresentaram resistência à tetraciclina pelo teste de difusão, utilizando-se tiras de Etest®. Destas, 15 estirpes foram resistentes, quatro estirpes apresentaram resistência intermediária e duas estirpes foram susceptíveis à tetraciclina pelo Etest®. Os valores da CIM para tetraciclina nas estirpes resistentes variou de 16 a 32 µg/mL. As estirpes intermediárias apresentaram CIM de 8 µg/mL e as estirpes susceptíveis apresentaram CIM de 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL.

Palavras-chave: antibióticos, penicilina, resistência, tetraciclina, concentração inibitória mínima

Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with mastitis

Abstract: Antimicrobial resistance is a complex issue and a serious public health problem. The use of antimicrobials in veterinary medicine and as growth promoters and disease prevention in agriculture and livestock farming is very intense and recent studies have confirmed the transfer of resistance genes from animal to man. *Staphylococcus aureus* is a pathogen responsible for food-borne infections, commonly found in milk and dairy products. The aim of the present study was to establish the resistance phenotype of *Staphylococcus aureus* strains isolated from milk of cows with subclinical mastitis. The antimicrobial resistance phenotype was evaluated by the disc diffusion susceptibility test, according to the recommendations of the Clinical Laboratory Standards Institute. Forty-two percent of the strains were susceptible to all antimicrobials tested; 39% were resistant only to penicillin and 12% were resistant to penicillin and tetracycline, concomitantly. Four strains showed multiresistance and no strain showed resistance to

methicillin. The percentage of resistance to penicillin found in this study was similar to that reported in other studies conducted with *S. aureus* from bovine mastitis in Brazil. In addition, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the 21 strains that showed resistance to tetracycline were determined by Etest® strips. Of these, 15 strains were resistant, four strains showed intermediate resistance and two strains were susceptible to tetracycline by Etest®. MIC values for tetracycline in resistant strains ranged from 16 to 32 µg/mL. Intermediate strains had MICs of 8 µg/mL and susceptible strains had MICs of 0.125 µg/mL and 0.250 µg/mL.

Keywords: antibiotics, penicillin, resistance, tetracycline, minimum inhibitory concentration

Introdução

O uso de antimicrobianos em animais de produção é um assunto de extrema importância e alvo de grande preocupação para a saúde pública por causa da potencial seleção de resistência aos antimicrobianos e a potencial transmissão de determinantes de resistência para a microbiota humana (WENDLANDT et al., 2013).

Staphylococcus aureus é um agente etiológico de mastite bovina frequentemente isolado dos rebanhos leiteiros brasileiros (RABELLO et al., 2005; SANTIAGO-NETO et al., 2014). É um patógeno responsável por toxi-infecções alimentares e comumente encontrado no leite e seus derivados (SPANU et al., 2014; JAMALI et al., 2015). A origem da contaminação dos produtos lácteos com *S. aureus* pode ser o leite do animal com mastite causada pelo patógeno, o ambiente ou os manipuladores. Além do risco de causarem toxi-infecções alimentares, quando os patógenos apresentam resistência aos antimicrobianos, as infecções podem ter o seu tratamento dificultado (CDC, 2017). O objetivo do presente estudo foi estabelecer o fenótipo de resistência de estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica.

Material e Métodos

O estudo foi conduzido com 134 estirpes de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite de rebanhos leiteiros das regiões Sul e Sudeste do Brasil. A resistência aos antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar com discos de antibióticos, de acordo com as recomendações do CLSI (2013a). As bactérias foram testadas com os seguintes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, UK): penicilina G (10 UI), ceftiofur (30 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), sulfonamidas 300 µg e trimetoprim/sulfametoxazol (25 µg). A estirpe *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade do teste.

Foi também determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) das estirpes resistentes à tetraciclina utilizando tiras de Etest® (Biomérieux, Hazelwood, MO, USA), de acordo com as recomendações do fabricante. A estirpe *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle do teste. Os resultados dos testes de susceptibilidade foram comparados com os pontos de corte descritos no documento VET01-S2 (CLSI, 2013b).

Resultados e Discussão

Foi pesquisada a susceptibilidade de 134 estirpes de *S. aureus* a dez antimicrobianos. Cinquenta e sete estirpes (42,5%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Cinquenta e duas estirpes (39%) foram resistentes somente à penicilina. Dezesesseis estirpes (12%) foram resistentes à penicilina e tetraciclina, concomitantemente. Duas estirpes (1,5%) foram resistentes somente à tetraciclina. Foi detectada ainda resistência à eritromicina (6 estirpes), clindamicina (3 estirpes) e sulfonamidas (1 estirpe). Quatro estirpes apresentaram multiresistência, que é a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Nenhuma estirpe analisada apresentou resistência à metilina, que foi testada com discos de cefoxitina.

Foi determinada a CIM (Etest®) das 21 estirpes que apresentaram resistência à tetraciclina pelo teste de difusão. Destas, 15 estirpes foram resistentes, quatro estirpes apresentaram resistência intermediária e duas estirpes foram susceptíveis à tetraciclina pelo Etest®. Os valores da CIM para tetraciclina nas estirpes resistentes variou de 16 a 32 µg/mL. As estirpes intermediárias apresentaram CIM de 8 µg/mL e as estirpes susceptíveis apresentaram CIM de 0,125 µg/mL e 0,250 µg/mL.

Totalizando, 73 estirpes (54,5%) deste estudo foram resistentes à penicilina, percentagem semelhante à reportada por Rabello et al. (2005) e Santiago-Neto et al. (2014) em *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de rebanhos leiteiros dos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Dezesesseis por cento das estirpes desse estudo apresentaram resistência à tetraciclina, percentagem superior à reportada nos estudos citados acima.

Dezesesseis estirpes (12%) foram resistentes à penicilina e tetraciclina, concomitantemente. Martini et al. (2017) também reportaram resistência concomitante à penicilina e tetraciclina em um grande número de estirpes (88%) de *S. aureus* isoladas de leite de vacas na Zona da Mata de Minas Gerais.

Não foi detectada resistência à meticilina nas estirpes de *S. aureus* desse estudo, nem tampouco em um estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa (SANTOS et al., 2016). Entretanto, resistência à meticilina em *S. aureus* isolados de mastite bovina foi reportada recentemente no Brasil por Guimarães et al. (2017).

Conclusões

O fenótipo de resistência apresentado com maior frequência pelas estirpes de *S. aureus* estudadas foi o de resistência à penicilina, e o percentual de resistência à penicilina foi semelhante aos relatados em outros estudos conduzidos com *S. aureus* de mastite bovina no Brasil. Nenhuma estirpe analisada apresentou resistência à meticilina; quatro estirpes apresentaram multirresistência, manifestada pela resistência concomitante a três ou mais classes de antimicrobianos.

Agradecimentos

À Embrapa e ao CNPq, pelo apoio financeiro (Embrapa 02.13.14.001.00.00 e CNPq 403098/2013-0). Ao CNPq e à Fapemig, pelas bolsas de Iniciação Científica de T.C.A. Oliveira e I.F. Evangelista.

REFERÊNCIAS

CDC - Centers for Diseases Control and Prevention. Atlanta, 2017. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/challenges/antibiotic-resistance.html>>. Acesso em: 17 abril 2017.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Approved Standard, 4th ed. CLSI document VET01–A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013a.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals**; Second Informational Supplement. CLSI document VET01–S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013b.

GUIMARÃES, F.F.; MANZI, M.P.; JOAQUIM, S.F.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; LANGONI, H. Short communication: Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-associated mastitis in a closed dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.726–730, 2017.

JAMALI, H.; PAYDAR, M.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S.; DADRASNIA, A. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v.54, p.383-388, 2015.

MARTINI, C.L.; LANGE, C.C.; BRITO, M.A.V.P.; RIBEIRO, J.B.; MENDONÇA, L.C.; VAZ, E.K. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022029917000061>

RABELLO, R.F.; SOUZA, C.R.V.M.; DUARTE, R.S.; LOPES, R.M.M.; TEIXEIRA, L.M.; CASTRO, A.C.D. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3211-3219, 2005.

SANTIAGO-NETO, W.; MACHADO, G.; PAIM, D.S.; CAMPOS, T.; BRITO, M.A.V.P.; CARDOSO, M.R.I.; CORBELLINI, L.G. Relação da idade na presença de bactérias resistentes a antimicrobianos em rebanhos leiteiros no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, p.613-620, 2014.

SANTOS, F.F.; MENDONÇA, L.C.; REIS, D.R.L.; GUIMARÃES, A.S.; LANGE, C.C.; RIBEIRO, J.B.; MACHADO, M.A.; BRITO, M.A.V.P. Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.1374–1382, 2016.

SPANU, V.; SCARANO, C.; COSSU, F.; PALA, C.; SPANU, C.; DE SANTIS, E.P.L. Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from raw sheep milk cheese. **Journal of Food Science**, v.79, n.10, p. M2066-M2071, 2014.

WENDLANDT, S.; FESSLER, A.T.; MONECKE, S.; EHRICHT, R.; SCHWARZ, S.; KADLEC, K. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, p.338–349, 2013.