

Susceptibilidade a antimicrobianos de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos isoladas de leite de vacas com infecção intramamária¹

Isabela Fagundes Evangelista², Marcos Aurélio Souto Silva³, Maria Aparecida V. P. Brito³, Carla Christine Lange^{3,4}

¹Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG. Parte do plano de ação "Coleção de Microrganismos de Interesse para Agroindústria e Pecuária (Embrapa, 01.15.02.001.07.03)", liderado por M.A.V.P. Brito

²Graduanda em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora/CES-JF. Bolsista PIBIC FAPEMIG. E-mail: isabela_jfnet@hotmail.com

³Pesquisador/Técnico, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: marcos.souto@embrapa.br, maria.brito@embrapa.br, carla.lange@embrapa.br

⁴Orientador

Resumo: A mastite é frequentemente o resultado de uma infecção intramamária, que pode ser causada por diferentes tipos de microrganismos. Os *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) são microrganismos oportunistas associados à pele dos animais e do homem, que causam mastite subclínica. Os SCN formam um grupo amplo e heterogêneo de bactérias, que compreende muitas espécies e subespécies. Aspectos de prevalência, ecologia e epidemiologia de SCN associados à mastite em vacas de leite ainda precisam ser elucidados. Neste estudo 161 estirpes de SCN isoladas de leite de vacas com ou sem sinais de mastite, de 49 rebanhos localizados em diferentes municípios dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entre os anos de 1996 e 2012, foram caracterizadas quanto ao fenótipo de resistência aos antimicrobianos. As estirpes foram previamente identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNA e estão mantidas em uma coleção biológica. A resistência aos antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar com discos de antibióticos, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute. A resistência apresentada com maior frequência pelas estirpes de SCN estudadas foi a resistência à penicilina, seguida pela resistência às sulfonamidas e à tetraciclina. *Staphylococcus epidermidis* foi a espécie de SCN que mais apresentou resistência aos antimicrobianos, incluindo multirresistência e quatro estirpes resistentes à meticilina, que indica resistência a todos os antibióticos betalactâmicos. *Staphylococcus chromogenes*, uma espécie de SCN adaptada aos bovinos, apresentou 3,7% de multirresistência e 48,8% de estirpes susceptíveis. A alta resistência aos antimicrobianos apresentada pelas estirpes de *S. epidermidis* desse estudo sugere que as mesmas possam ter como origem o ser humano, uma vez que a espécie é ubiqüitária da pele humana e grande reservatório de genes de resistência.

Palavras-chave: MRSE, multirresistência, resistência à meticilina, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*

Antimicrobial susceptibility of coagulase negative *Staphylococcus* species isolated from milk of cows with intramammary infection

Abstract: Mastitis is often the result of an intramammary infection, which can be caused by different types of microorganisms. Coagulase negative *Staphylococcus* (CNS) are considered opportunistic microorganisms associated with the skin of animals and man, which cause subclinical mastitis. CNS form a large and heterogeneous group of bacteria, which comprises many species and subspecies. Aspects of prevalence, ecology and epidemiology of CNS associated with mastitis in dairy cows still need to be elucidated. In this study, 161 SCN strains isolated from milk of cows with or without signs of mastitis, from 49 herds located in different municipalities of Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul states, between the years of 1996 and 2012, were characterized according to antimicrobial resistance phenotype. Strains were previously identified by 16S RNA gene sequencing and are maintained in a biological collection. Antimicrobial resistance was evaluated by the agar diffusion test with antibiotic discs, according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute. Penicillin resistance was the most frequently presented by the SCN strains, followed by resistance to sulfonamides and tetracycline. *Staphylococcus epidermidis* was the CNS species that showed more antimicrobial resistance, including multiresistance and four methicillin-resistant strains, indicating resistance to all beta-lactam antibiotics. *Staphylococcus chromogenes*, a bovine-adapted CNS species, presented 3.7% of multiresistance and 48.8% of susceptible strains. The high resistance to antimicrobials presented by *S. epidermidis* strains suggests that they can originate from the human being, since the species is ubiquitous of the human skin and large reservoir of resistance genes.

Keywords: methicillin resistance, MRSE, multiresistance, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus epidermidis*

Introdução

A mastite é a doença mais comum e dispendiosa do setor leiteiro. É frequentemente o resultado de uma infecção intramamária, que pode ser causada por diferentes tipos de microrganismos. Os *Staphylococcus coagulase negativos* (SCN) são considerados microrganismos oportunistas associados à pele dos animais e do homem, que causam mastite subclínica, principalmente em propriedades leiteiras bem manejadas, que têm sob controle os patógenos contagiosos (SCHUKKEN et al., 2009).

Os SCN formam um grupo amplo e heterogêneo de bactérias, compreendido por várias espécies e subespécies (LPSN, 2018). Estudos recentes (DE VISSCHER et al., 2014; VANDERHAEGHEN et al., 2015) têm focado na prevalência, ecologia e epidemiologia de SCN associados à mastite em vacas de leite, com o objetivo de estabelecer a participação de cada espécie na mastite bovina, que ainda não é clara. O objetivo desta atividade de pesquisa foi caracterizar o fenótipo de resistência a antimicrobianos de espécies de SCN isoladas de leite de vacas com infecção intramamária, mantidas numa coleção biológica e já identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Material e Métodos

Foram utilizadas neste estudo 161 estirpes de SCN pertencentes à Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária. As estirpes foram isoladas de leite de vacas com ou sem sinais de mastite, de 49 rebanhos leiteiros localizados em diferentes municípios dos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entre os anos de 1996 e 2012. As estirpes foram previamente identificadas pelo sequenciamento do gene 16S RNA (LANGE et al., 2015).

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), ceftiofur (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. Os resultados dos testes de susceptibilidade foram comparados com os pontos de corte descritos no documento VET01-S2 (CLSI, 2013b).

Resultados e Discussão

Foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos 161 estirpes de SCN, pertencentes às seguintes espécies: *S. chromogenes* (82), *S. epidermidis* (28), *S. haemolyticus* (12), *S. sciuri* (11), *S. hyicus* (10), *S. simulans* (8), *S. agnetis* (4), *S. intermedius* (1), *S. auricularis* (1), *S. succinus* (1), *S. pasteurii* (1), *S. devriesei* (1) e *S. caprae* (1).

A resistência apresentada com maior frequência pelas estirpes de SCN estudadas, isolada ou concomitante com resistência a outros antimicrobianos, foi à penicilina, seguida pela resistência às sulfonamidas e à tetraciclina. Os percentuais de resistência das estirpes deste estudo foram menores do que os relatados por Santiago-Neto et al. (2014) em SCN isolados de leite de vacas em diferentes rebanhos leiteiros do Rio Grande do Sul, com exceção da resistência às sulfonamidas e tetraciclina, que foram superiores no presente estudo. Nenhuma estirpe apresentou resistência à cefalotina e ao ceftiofur, cefalosporinas de primeira e terceira geração, respectivamente. Quatro estirpes pertencentes à espécie *S. epidermidis* apresentaram resistência à ceftiofur, que indica a possibilidade de possuírem o gene *mecA*, que confere resistência à meticilina e a todos os antibióticos betalactâmicos.

Do total de estirpes analisadas, 39,7% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Trinta e três por cento das estirpes apresentaram resistência a um único antimicrobiano, 9,9% apresentaram resistência a dois antimicrobianos de classes diferentes e 17,4% apresentaram multirresistência, que é a resistência concomitante a três ou mais classes de antimicrobianos.

S. epidermidis foi a espécie de SCN que mais apresentou resistência aos antimicrobianos: 71,4% das estirpes apresentaram multirresistência, e somente uma estirpe (3,6%) foi susceptível a todos os antimicrobianos testados. *S. epidermidis* é uma espécie adaptada ao ser humano e muitos casos de infecção intramamária em bovinos parecem ter como fonte de infecção o ser humano (VANDERHAEGHEN et al., 2015). Em contrapartida, *S. chromogenes*, uma espécie de SCN adaptada aos bovinos, apresentou 3,7% de multirresistência e 48,8% de estirpes susceptíveis. A alta resistência aos antimicrobianos apresentada pelas estirpes de *S. epidermidis* desse estudo sugere que as mesmas possam ter como origem o ser humano, uma vez que a espécie é ubiqüitária da pele humana e grande reservatório de genes de resistência (Otto, 2009).

Conclusões

O fenótipo de resistência apresentado com maior frequência pelas estirpes de SCN desse estudo foi o de resistência à penicilina, seguida pela resistência às sulfonamidas, individualmente ou concomitante com

resistência a outros antimicrobianos. *S. epidermidis* foi a espécie de SCN que mais apresentou resistência aos antimicrobianos, incluindo multirresistência. Quatro estirpes de *S. epidermidis* apresentaram resistência à cefoxitina, que indica se tratarem de estirpes resistentes à meticilina (*Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina – MRSE).

Agradecimentos

À Embrapa e ao CNPq, pelo apoio financeiro (Embrapa 01.15.02.001.07.03 e CNPq 403098/2013-0). À Fapemig, pela bolsa de Iniciação Científica de I.F. Evangelista.

Referências

- 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.
- DE VISSCHER, A.; SUPRÉ, K.; HAESBROUCK, F.; ZADOKS, R. N.; PIESSENS, V.; COILLIE, E. V.; PIEPERS, S.; DE VliegHER, S. Further evidence for the existence of environmental and host-associated species of coagulase-negative staphylococci in dairy cattle. **Veterinary Microbiology**, v.172, p.466–474, 2014.
- LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; REIS, D. R. L.; MACHADO, M. A.; GUIMARÃES, A. S.; AZEVEDO, A. L. S.; SALES, E. B.; ALVIM, M. C. T.; SILVA, F. S.; MEURER, I. R. Species-level identification of staphylococci isolated from bovine mastitis in Brazil using partial 16S rRNA sequencing. **Veterinary Microbiology**, v.76, p.382-388, 2015.
- LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature, 2018. Disponível em: www.bacterio.net/staphylococcus.html Acesso em 24 de janeiro de 2018.
- OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* - the 'accidental' pathogen. **Nature Reviews**, v.7, p.555-567, 2009.
- 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, n.7, p.613-620, 2014.
- SCHUKKEN, Y. H.; GONZÁLEZ, R. N.; TIKOFSKY, L. L.; SCHULTE, H. F.; SANTISTEBAN, C. G.; WELCOME, F. L.; BENNET, G. J.; ZURAKOWSKI, M. J.; ZADOKS, R. N. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v.34, p.9-14, 2009.
- VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; COILLIE, E. V.; HAESBROUCK, F.; DE VliegHER, S. Identification, typing, ecology and epidemiology of coagulase negative staphylococci associated with ruminants. **The Veterinary Journal**, v.203, p.44-51, 2015.