

## XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

### Susceptibilidade a Antimicrobianos de Espécies de *Staphylococcus* Isoladas de Leite de Búfalas com Infecção Intramamária<sup>1</sup>

Pedro Carmanini de Mello<sup>2</sup>, Marcos Aurélio Souto e Silva<sup>3</sup>, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito<sup>3</sup>, Carla Christine Lange<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>O presente trabalho foi realizado com apoio da 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 Maria A. V. P. Brito

<sup>2</sup>Graduando em Medicina Veterinária – UFJF/Juiz de Fora. Bolsista da Fapemig. E-mail: pedrocarmaninimello@hotmail.com

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

<sup>4</sup>Orientador

**Resumo:** A resistência a antimicrobianos é um assunto de interesse em Medicina Veterinária assim como em Saúde Pública. Espécies do gênero *Staphylococcus* são agentes etiológicos frequentes de mastite bovina e bubalina e os padrões de resistência podem diferir consideravelmente entre as diferentes espécies, sendo necessária não somente a identificação das mesmas, mas também conhecer suas características de susceptibilidade ou resistência. O objetivo do presente estudo foi o de estabelecer o fenótipo de resistência de estirpes de *Staphylococcus* isoladas de amostras de leite de búfalas com infecção intramamária. O fenótipo de resistência foi avaliado pelo teste de difusão em ágar com discos de antibióticos. Quarenta e quatro estirpes (62%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Dezesete estirpes (24%) foram resistentes às sulfonamidas e nove estirpes (12,6%) foram resistentes à penicilina. Treze estirpes de *S. chromogenes* não apresentaram crescimento satisfatório em ágar Mueller-Hinton, para a realização dos testes com estas estirpes foi necessário o enriquecimento do meio com soro de bovino. As estirpes de *S. aureus* e *S. chromogenes* deste estudo apresentaram menor resistência à penicilina, se comparada a resultados de estudos anteriores, entretanto as estirpes de *S. chromogenes* apresentaram maior resistência às sulfonamidas.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, sulfonamidas, resistência

### Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* Species Isolated from Milk of Buffalo Cows with Intramammary Infection

**Abstract:** Antimicrobial resistance is a subject of interest in Veterinary Medicine as well as in Public Health. Species of the genus *Staphylococcus* are frequent etiological agents of bovine and buffalo mastitis. Identifying the different species that cause intramammary infections and knowing their resistance patterns are subjects of great importance. The objective of the present study was to access the resistance phenotype of *Staphylococcus* isolates from milk of buffalo cows with intramammary infection. The resistance phenotype was evaluated by the agar diffusion test with antibiotic discs. Forty-four strains (62%) were susceptible to all antimicrobials tested. Seventeen strains (24%) were resistant to sulfonamides and nine strains (12.6%) were resistant to penicillin. Thirteen strains of *S. chromogenes* did not show satisfactory growth on Mueller-Hinton agar used for the susceptibility tests, and it was necessary to enrich the medium with bovine serum. *S. aureus* and *S. chromogenes* strains of this study showed lower resistance to penicillin compared to results from previous studies. However, *S. chromogenes* strains presented higher resistance to sulfonamides.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus hyicus*, sulfonamides, resistance

## XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

### INTRODUÇÃO

A utilização de forma indiscriminada ou errônea de antimicrobianos como medida terapêutica ou de profilaxia para tratamento de doenças e ganho em índices de crescimento e eficiência alimentar em diferentes espécies animais contribui para a seleção de microrganismos resistentes a antimicrobianos usados em medicina veterinária e medicina humana (Teuber, 2001).

A mastite é uma inflamação da glândula mamária frequentemente causada por bactérias do gênero *Staphylococcus*. *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico de mastite bovina frequentemente isolado dos rebanhos leiteiros brasileiros (Santiago-Neto et al., 2014), e muita informação a respeito deste agente é encontrada na literatura. Em contrapartida, estudos com *Staphylococcus coagulase-negativa* (SCN) são feitos de forma menos intensiva, seja pelo fato de que a doença causada por estes microrganismos ser de curso relativamente moderado, seja pela dificuldade de identificação das diferentes espécies de SCN (DEVRIESE, 2002). Entretanto, o impacto econômico causado por esta manifestação e os padrões de resistência podem diferir consideravelmente entre as espécies de *Staphylococcus*, tornando-se necessária a identificação das diferentes espécies e as características inerentes a elas.

O objetivo do presente estudo foi estabelecer o fenótipo de resistência de três espécies de *Staphylococcus* isoladas de leite de búfalas com infecção intramamária.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 71 estirpes de *Staphylococcus*, 30 *S. aureus*, 40 *S. chromogenes* e um *S. hyicus*, isoladas de amostras de leite de búfalas com mastite subclínica, coletadas entre março e novembro 2003, de rebanhos leiteiros localizados nos municípios de Luz, Dolores do Indaiá, Estrela do Indaiá e Córrego Danta, na região do Alto São Francisco, Minas Gerais. As estirpes foram previamente identificadas por características fenotípicas, PCR do gene *femA* e pelo sequenciamento dos genes 16S rRNA e *tuf* (Carvalho et al., 2007; Santos et al., 2015) e mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa Gado de Leite.

A resistência aos antimicrobianos foi testada pelo teste de difusão em ágar com discos de antibióticos, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013a), com os seguintes antimicrobianos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido): penicilina G (10 UI), ceftiofur (30 µg), cefalotina (30 µg), cefoxitina (30 µg), tetraciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), sulfonamidas (300 µg) e trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg). A estirpe *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle de qualidade do teste. A leitura foi realizada comparando-se os resultados com os pontos de corte descritos no documento VET01-S2 (CLSI, 2013b).

Durante a realização dos testes, foi observado que treze estirpes de *S. chromogenes* não apresentaram crescimento confluyente ou não cresceram em ágar Mueller-Hinton. Todas as etapas do teste e os reagentes e materiais utilizados foram retestados, e não se detectou nenhum problema que pudesse levar à inibição do crescimento destas estirpes. Desta forma, foi adicionado 5% de soro de bovino ao ágar Mueller-Hinton. As estirpes apresentaram crescimento confluyente no meio adicionado de soro, o que permitiu a realização dos testes. A estirpe *S. aureus* ATCC 25923, utilizada como controle de qualidade do teste, apresentou halos de inibição dentro dos limites recomendados pelo CLSI também no ágar Mueller-Hinton adicionado de soro.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 30 estirpes de *S. aureus* testadas, todas foram susceptíveis à cefalotina, cefoxitina, ceftiofur, clindamicina, enrofloxacina, gentamicina e sulfametoxazol com trimetoprim. Vinte e uma estirpes de *S. aureus* (70%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Seis estirpes foram resistentes à penicilina, uma estirpe resistente à penicilina e eritromicina, uma estirpe resistente à penicilina e tetraciclina, e duas estirpes resistentes às sulfonamidas.

Das 40 estirpes de *S. chromogenes* testadas, todas foram susceptíveis à cefalotina, cefoxitina, ceftiofur, clindamicina, enrofloxacina, gentamicina, tetraciclina e sulfametoxazol com trimetoprim. Vinte e quatro estirpes (60%) de *S. chromogenes* foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Quinze

## XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

estirpes de *S. chromogenes* apresentaram resistência às sulfonamidas (37,5%) e uma apresentou resistência à penicilina. A única estirpe de *S. hyicus* foi susceptível a todos os antimicrobianos testados.

Se comparado com estudos realizados com *S. aureus* (Oliveira et al., 2017) e SCN (Bonna et al., 2007; Evangelista et al., 2018) isolados de mastite bovina e bubalina, as estirpes isoladas de búfalas deste estudo apresentaram menor resistência à penicilina, entretanto as estirpes de *S. chromogenes* apresentaram maior resistência às sulfonamidas. Em função do grande número de estirpes de *S. chromogenes* resistentes às sulfonamidas, característica também observada em estudo anterior (Evangelista et al., 2018) com esta e outras espécies coagulase negativas isoladas de mastite bovina, pretende-se confirmar a resistência das estirpes a este antimicrobiano estabelecendo-se as concentrações inibitórias mínimas do antimicrobiano para as diferentes estirpes.

Em relação às treze estirpes de *S. chromogenes* que não cresceram de forma satisfatória no ágar Mueller-Hinton, não foram encontradas informações na literatura relativas ao comportamento fastidioso desta espécie nesse meio de cultura. Foi encontrada, entretanto, referência a estirpes de *S. hyicus* isoladas de suínos com dermatite exsudativa com comportamento atípico em caldo Mueller-Hinton, quando testadas com as sulfonamidas e o trimetoprim (Wegener et al., 1999).

### CONCLUSÕES

As estirpes de *S. aureus* e *S. chromogenes* deste estudo apresentaram menor resistência à penicilina, quando se compara os resultados com os de estudos anteriores, entretanto as estirpes de *S. chromogenes* apresentaram maior resistência às sulfonamidas. A alta resistência às sulfonamidas será melhor investigada futuramente.

### AGRADECIMENTOS

À Embrapa, pelo apoio financeiro (Embrapa 01.15.02.001.07.03). À Fapemig, pela bolsa de Iniciação Científica de P. C. Mello.

### REFERÊNCIAS

BONNA, I. C. F.; SANTOS, A. P. V.; TEIXEIRA, G. N.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. *Staphylococcus* coagulase-negativos resistentes a drogas isolados de leite de búfalas (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 117-121, 2007.

CARVALHO, L. B.; AMARAL, F. R.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C.; BRITO, J. R. F.; LEITE, R. C. 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.

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.

DEVRIESE, L. A.; BAELE, M.; VANECHOUTTE, M.; MARTEL, A.; HAESBROUCK, F. Identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus chromogenes* isolates from intramammary infections of dairy cows. **Veterinary Microbiology**, v. 87, p.175–182, 2002.

EVANGELISTA, I. F.; SILVA, M. A. S.; BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. **Susceptibilidade a antimicrobianos de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos isoladas de leite de vacas com infecção intramamária**. XXI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite, 2018. 1 CD.

XXIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG – 21 de fevereiro de 2019

OLIVEIRA, T.C.A.; EVANGELISTA, I.F.; MÜLLER, K.A.; BRITO, M.A.V.P.; MENDES, R.F.; LANGE, C.C. **Susceptibilidade a antimicrobianos de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite**. 31º Congresso Nacional de Laticínios, 2017. 1 CD.

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.

SANTOS, D. C.; LANGE, C. C.; AVELLAR-COSTA, P.; SANTOS, K. R. N.; BRITO, M. A. V. P.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. *Staphylococcus chromogenes*, a coagulase-negative *Staphylococcus* species that can clot plasma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1372-1375, 2016.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 493-499, 2001.

WEGENER, H. C.; WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY JR., R. J. Antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococcus hyicus* isolated from exsudative dermatitis in pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 793-795, 1999.