

IDENTIFICAÇÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ENVOLVIDOS EM MASTITES NA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL E SUA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

MARIA GABRIELA CUSTODIO KOBAYASHI¹; LUCAS SCHAEFER BATISTA²;
SILVIA REGINA LEAL LADEIRA³; RITA DE CÁSSIA DOS SANTOS DA
CONCEIÇÃO⁴; HELENICE GONZALEZ DE LIMA⁵; PATRÍCIA DA SILVA
NASCENTE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – mariagabriela.mgk@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – lbatistasul@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – s.ladeira@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – ritinhaconceicao@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – helenicegonzalez@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – pattsn@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença de extrema importância para a produção leiteira. Conceitualmente, é o processo inflamatório da glândula mamária, normalmente associado com origem infecciosa, cuja etiologia pode ser bastante diversa, a depender da localização geográfica (SANTOS & FONSECA, 2019).

Em 2013, BANDEIRA et al. identificou a presença de *Staphylococcus aureus* em mastites bovinas na região sul do Rio Grande do Sul. Em 2017, Dal VESCO et al. verificou altos níveis de resistência antimicrobiana para Penicilina, Cefalexina, Gentamicina, Neomicina, Tetraciclina e Trimetoprima para estafilococos coagulase positiva de mastites bovinas, na mesma região, porém sem definir a espécie bacteriana, apenas o gênero: *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus aureus é uma das bactérias de preocupação para a saúde mundial por multirresistência, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Dessa forma, o objetivo deste trabalho é identificar a presença de *S. aureus* multirresistentes associados com quadros de mastites em bovinos leiteiros.

2. METODOLOGIA

Foram isoladas colônias bacterianas em Ágar Sangue Acumedia® a partir da semeadura por esgotamento de leite mastítico recebidos no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal de Pelotas (LIPOA/UFPEL) através de projetos de extensão. As colônias foram submetidas à identificação bioquímica conforme SANTOS e FONSECA, 2019, e antibiograma conforme o CLSI, 2024. Ao todo foram analisadas 44 amostras.

Inicialmente realizaram-se esfregaços para realização de microscopia, utilizando-se a coloração de Gram. Na microscopia procuraram-se cocos Gram-positivos. Os demais isolados foram descartados.

Para identificação do gênero, utilizou-se a prova bioquímica de catalase com peróxido de hidrogênio 10 volumes. Como controle positivo do peróxido de hidrogênio utilizou-se a ATCC 25923, de *Staphylococcus aureus*. Isolados com resultado negativo na prova da catalase foram descartados, os que obtiveram resultado positivo foram identificados como pertencentes do gênero *Staphylococcus* sp.

A classificação como pertencente ao grupo “coagulase positivo”, ou “coagulase negativo” se deu através da detecção da enzima coagulase. Para realização do ensaio, foi selecionada uma colônia de cada isolado multiplicado em

ágar sangue, catalase positivo, e incubada em caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI), Oxoid®, por 24h à 37°C. Juntamente com os isolados foram incubados tubos contendo caldo BHI estéril da mesma partida dos tubos utilizados para os isolados, como controle negativo. Após a verificação de aumento da densidade óptica comparada ao controle negativo, incubou-se por 24 horas à 37°C em eppendorfs 0,1 ml de caldo BHI com a colônia multiplicada e 0,3ml de plasma equino. Realizaram-se leituras consecutivas com 6h, 18h e 24h de incubação. Aqueles isolados que em qualquer uma das leituras coagularam o plasma foram considerados “coagulase positiva”, enquanto aqueles que ao final de 24h não apresentaram qualquer formação de coágulo, foram considerados “coagulase negativo”, e foram descartados. Para realização do ensaio utilizou-se o BHI estéril incubado juntamente com os isolados como controle negativo, e a ATCC 25923 como controle positivo.

Para classificação na espécie *S. aureus* realizou-se o teste de Voges-Proskauer (VP). Segundo ZELON, et al. (2009) isolados de *Staphylococcus* sp. coagulase positivo, com resultado positivo no teste de VP são *Staphylococcus aureus*. Para realização do ensaio, incubou-se por 48h a 37°C uma colônia do isolado em um ml de caldo MR-VP, Himedia®. Juntamente com os isolados incubaram-se tubos de MR-VP estéreis de mesma partida, a fim de verificar a diferença na densidade óptica após a incubação. Todos os tubos contendo isolados coagulase positivo tiveram aumento na densidade óptica. Após a realização do teste, os isolados que obtiveram resultado positivo passaram a ser considerados *S. aureus*. Utilizou-se como controle negativo *Escherichia coli* ATCC 25922, e como controle positivo *S. aureus* ATCC 25923.

Foi realizado antibiograma para todos os isolados de *S. aureus*, buscando-se isolados multirresistentes. Utilizou-se a técnica de discos de difusão, conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility test* (BrCast). Testou-se a sensibilidade para Penicilina G, Oxacilina, Ampicilina, Ampicilina com Sulbactam, Amoxicilina com Clavulanato, Piperacilina com Tazobactam, Cefalexina, Cefazolina, Cefalotina, Cefuroxima, Cefoxitina, Ceftriaxona, Cefotaxima, Ceftiofur, Cefepima, Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Vancomicina, Amicacina, Gentamicina, Neomicina, Azitromicina, Eritromicina, Clindamicina, Doxiciclina, Tetraciclina, Minociclina, Linezolida, Cloranfenicol, Rifampicina, Ciprofloxacino, Enrofloxacino, Moxifloxacino, Levofloxacino, Cotrimazol, Sulfonamidas e Trimetoprima.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 44 amostras analisadas, oito não tiveram crescimento com 48h de incubação em Ágar Sangue. Foi realizado Gram de 36 isolados, sendo que 12 foram descartados por não serem cocos Gram-Positivos. Os 24 cocos Gram-positivos foram submetidos a catalase, e todos foram positivos, portanto houveram 24 isolados de *Staphylococcus* sp. Posteriormente, na prova da coagulase, cinco foram coagulase negativa, e no teste de VP, apenas uma foi negativa. A partir desses resultados, conclui-se que haviam 18 *S. aureus* nas amostras analisadas.

No antibiograma foi verificada a presença de apenas um isolado multirresistente. Os resultados dos antibiogramas de todos os isolados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Resultado do antibiograma dos 18 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras de leite mastítico.

Antibiótico/Isolado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Total de isolados Resistentes
Penicilina G	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
Oxacilina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ampicilina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
Amoxicilina+Clavulanato	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ampicilina+Sulbactam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Piperacilina+Tazobactam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefalexina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefalotina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefazolina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefuroxima	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
Cefoxitina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ceftriaxona	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefotaxima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ceftiofur	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cefepima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Imipenem	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Meropeném	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ertapeném	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Vancomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	1
Teicoplanina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Amicacina	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1 intermediário
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Neomicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1
Bacitracina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
Azitromicina	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2 intermediários
Eritromicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Clindamicina	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
Doxiciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Minociclina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Linezolida	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Rifampicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Ciprofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Enrofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Moxifloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Levofloxacino	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Clotrimazol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Sulfonamidas	S	S	S	I	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3 intermediários
Trimetoprima	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
Total																			
resistência/resistência intermediária	1	1	0	6	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	10

S- Isolado sensível; I- Isolado com resistência intermediária; R- Isolado resistente

A resistência aos fármacos ocorre por diferentes mecanismos conformacionais e/ou metabólicos, que conferem aos microrganismos a capacidade de sobreviver, se multiplicar, manifestar seus fatores de virulência, mesmo estando em meio a concentrações terapêuticas do princípio ativo. No presente estudo, foi encontrado um isolado multirresistente, que conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são isolados com resistência a três fármacos de classes distintas.

Chama a atenção que mesmo em uma pequena amostra, foi verificada a presença de algum grau de resistência para dez diferentes princípios ativos, que

representam 25% dos antimicrobianos testados. O presente estudo demonstra a necessidade de um levantamento epidemiológico com uma amostra significativa na região, a fim de verificar o perfil de sensibilidade de *S. aureus* em mastites da região geográfica.

Os antimicrobianos que apresentaram um maior número de isolados com algum grau de resistência foram as sulfonamidas e bacitracina, respectivamente. Alguns princípios ativos não apresentaram, na amostra analisada, isolados com qualquer grau de resistência, entretanto é necessário ponderar o pequeno tamanho da amostra.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo conclui-se que há a presença de *S. aureus* multirresistente em mastites nos rebanhos leiteiros na região sul do Rio Grande do Sul. Sendo assim, é necessária a sequência do presente estudo a fim de estabelecer o perfil de sensibilidade aos princípios ativos a partir de um número maior de isolados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, F. S.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; SILVA, W. P.; FISCHER, G. Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. Arquivos do Instituto Biológico, v.80, n.1, p.1-6, 2013;

BRASIL, Microbiologia Clínica para o Controle e Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília: Anvisa, 2020.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING, Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. BrCAST, 2024.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 34^a edição. CLSI supplement M100. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2024.

DAL VESCO, J; SIEBEL, J. C.; SUZIN, G. O.; CERESER, N. D.; GONZALEZ, H. L.; Monitoramento dos agentes causadores de mastite e a susceptibilidade aos antimicrobianos. Expressa Extensão, v. 22, n.1, p.34-50, 2017.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L.; Controle de mastite e qualidade do leite – Desafios e soluções. Pirassununga/SP: Edição dos Autores, 2019.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH; One Health. Disponível em <https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>, acesso em 30/05/2024.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; FILHO, A. N.; FERREIRA, L. M.; Utilização do Teste de Voges-Proskauer e da Coagulase para o Diagnóstico Laboratorial de *Staphylococcus aureus* Envolvidos na Epidemiologia da Mastite Bovina. Ciência Animal Brasileira, v.10, p.1285-1293, 2009.