

A IMPORTÂNCIA DOS ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVOS NA MASTITE BOVINA SUBCLÍNICA E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Simone Baldini Lucheis

Med. Vet., Pós-doutorado, PqC do Polo Regional Centro Oeste/APTA

silucheis@apta.sp.gov.br

Mastites subclínicas ocasionadas por infecções intramamárias por estafilococos coagulase negativos (ECN) têm sido relatados em muitos sistemas de produção leiteira no mundo todo (THORBERG et al., 2009). Mais de 50 espécies e subespécies de estafilococos têm sido caracterizados. O gênero é dividido em estafilococos coagulase positivos e estafilococos coagulase negativos (ECN), baseado na sua habilidade em coagular o plasma (PYÖRÄLÄ e TAPONEN, 2009). Comumente, a diferenciação entre espécies de ECN é baseada nas propriedades morfológicas e bioquímicas.

No diagnóstico de mastite de rotina, ECN têm sido tradicionalmente considerados patógenos menores, especialmente em relação ao *Staphylococcus aureus*, estreptococos e coliformes. A principal razão para isso é que mastites causadas por ECN são geralmente brandas e geralmente permanecem subclínicas. A infecção por ECN também está associada ao aumento da contagem de células somáticas (CCS), o que pode resultar em perdas econômicas devido a desvalorização da qualidade do leite, bem como a diminuição da produção de leite (TAPONEN et al., 2006).

Mastites clínicas e subclínicas causadas por infecções intra-mamárias com ECN é comum em muitas fazendas leiteiras do mundo todo. Em alguns rebanhos, as infecções por ECN podem levar a altos níveis de CCS no tanque de expansão, ao aumento de casos de mastite clínica, ou ambos. Entretanto, as informações a respeito de como a infecção começa e se alastra pelo rebanho com a infecção pelos ECN são precárias.

Os estudos relacionados à mastite por ECN são complicados, tendo em vista que os ECN são comumente referidos como pertencentes a um grupo de bactérias, mas que na realidade consistem em diferentes espécies. Mais de dez diferentes espécies têm sido

isoladas a partir de amostras de leite bovino mastítico e as espécies mais comumente relatadas são *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans*. *Staphylococcus epidermidis* também têm sido frequentemente isolado. As espécies mais comumente encontradas são *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus*. Outros ECN frequentemente mencionados são *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi* e *S. lugdunensis* (THORBERG et al., 2006).

Para as mastites por ECN, assim como para outros agentes, a prevenção é a chave para combater o problema. Entretanto, mais conhecimento e experiência são necessários para que o controle e as estratégias de prevenção sejam efetivas. ECN tendem a ser mais resistentes do que *S. aureus*, e facilmente desenvolvem multirresistência. O mecanismo de resistência mais comum é a produção de beta-lactamases, o que resulta a resistência para penicilina G e aminopenicilinas, e alguns destes podem carregar o gene *mecA* de resistência a oxacilina. Pelo uso indiscriminado de antibióticos, cepas multirresistentes são isoladas de bovinos com mastites por ECN, dificultando portanto o seu controle (MACHADO et al. 2008).

O presente estudo descreve a identificação de cepas de ECN causadoras de mastite subclínica, isoladas de dez diferentes propriedades de rebanhos bovinos do Estado de São Paulo e o perfil de sensibilidade destes agentes aos antimicrobianos comumente utilizados em medicina veterinária.

Colônias bacterianas suspeitas (com 2 a 3 mm de diâmetro, de coloração branca a amarelo dourado e hemolíticas (Quinn et al., 1994) foram coradas pelo método de Gram com o objetivo de visualizar morfologia e característica tintorial. Cocos agrupados em forma de “cacho-de-uva”, Gram positivos, foram submetidos às provas de catalase e coagulase (KONEMAN et al, 2008). O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus*, com base nas provas de oxidação e fermentação da glicose, e pela resistência à bacitracina (0,04 U), indicada pela ausência de halo de inibição ou formação de halo de até 9 mm e pela sensibilidade à furazolidona (100 mg) caracterizada por halos de inibição de 15 a 35 mm de diâmetro (BAKER, 1984).

Posteriormente, foram realizadas as provas de fermentação de açúcares maltose, trealose, manitol, resistência à polimixina B (300UI) e β -galactosidase, com a finalidade de diferenciar *S.aureus* de outros *Staphylococcus* coagulase-positiva, como *S. intermedius*, *S. scheiferi* subsp. *coagulans* e *S. hyicus* (KONEMAN et al. 2008). Posteriormente à confirmação da

espécie, as amostras foram conservadas em caldo cérebro coração com glicerol a 25% e mantidas em freezer a - 80°C.

Para a diferenciação das espécies de ECN foi utilizado o método simples modificado proposto por Cunha et al. (2004), o qual consiste na fermentação dos açúcares xilose, sacarose, trealose, maltose e manitol, produção de hemolisina e crescimento anaeróbico em caldo tioglicolato. As linhagens foram mantidas a 37°C por 72 horas. Quando necessário e de acordo com os resultados obtidos no método simples modificado, para complementar a classificação das diferentes espécies e subespécies de ECN também foram utilizadas como provas bioquímicas redução de nitrato, produção de urease e/ou ornitina descarboxilase, fermentação de β -D-frutose e resistência a novobiocina (5 μ g). Foram realizadas ainda antibiogramas com a utilização dos discos de novobiocina (5 μ g) e polimixina B (300 UI), bem como furazolidona (100 μ g) e bacitracina (0,04 UI), para diferenciação entre os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus* (KONEMAN et al., 2008). Cepas de referência internacional de espécies de ECN foram utilizadas como controle, *S. epidermidis* (ATCC12228), *S. simulans* (ATCC 27851), *S. warneri* (ATCC 10209), *S. xylosus* (ATCC 29979) e *S. saprophyticus* (ATCC 15305).

Resultados

Foi realizado perfil de sensibilidade antimicrobiana para todas as amostras de estafilococos isoladas, de acordo com Bauer et al. (1966), em placas contendo Agar Mueller Hinton. Foram utilizadas as seguintes drogas para o antibiograma: gentamicina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g), penicilina G (10 U.I.), neomicina (30 μ g), ampicilina (10 μ g), sulfazotrim (25 μ g), oxacilina (10 μ g), cefalexina (30 μ g) e enrofloxacina (5 μ g).

Um total de 158 cepas de *Staphylococcus* spp. foram identificadas, sendo 61 (38,6%) amostras de estafilococos coagulase positivos e 97 (61,4 %) amostras de estafilococos coagulase negativos. Destes, as espécies identificadas foram *S. warneri* (30,7%), *S. pasteurii* (17,8%) e *S. saprophyticus* subesp. *bovis* (15,8%), seguido por *S. lugdunensis* (9,9%), *S. auricularis* (6,9%), *S. haemolyticus* (3,9%), *S. epidermidis* (3,0%), *S. xylosus* (3,0%), *S. schleiferi* subesp. *schleiferi* (3,0%), *S. sciuri* subesp. *sciuri* (2,0%), *S. capitis* subesp. *urealyticus* (2,0%), *S. muscae* (1,0%) e *S. carnosus* subesp. *carnosus* (1,0%)

As 97 amostras de estafilococos coagulase negativas revelaram 47,4% das amostras resistentes a ampicilina (10 µg), 46,4% resistentes a penicilina G (10 UI), 27,8% resistentes a tetraciclina (30 µg), 12,4% resistentes a enrofloxacina, 10,3% resistentes à neomicina, 11,3% resistentes a gentamicina(10µg) e sulfadiazina (25 µg), 9,3% resistentes a oxacilina (10 µg) e 5,2% resistentes a cefalexina (30 µg), não havendo diferença estatisticamente significativa em relação ao perfil de sensibilidade antimicrobiana para as nove drogas testadas.

Nas duas últimas décadas, os ECN têm emergido como agentes patógenos significativos tanto para medicina humana quanto para medicina veterinária (SAWANT et al., 2009). A presença de beta-lactamases em ECN tem sido observada em isolamentos procedentes de humanos e animais. A produção de beta-lactamases tem sido relatada em 21 a 84% dos ECN isolados de vacas leiteiras com mastites. Mais recentemente, Taponen et al. (2006) relataram a presença de beta-lactamases em 19% dos ECN que causaram mastite em vacas lactantes.

Estafilococos coagulase negativos apresentam uma ampla variedade de espécies. Relatos da literatura incluem como espécies predominantes isoladas de rebanhos leiteiros *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. hominis* e *S. xylosus* (LUTHJE e SCHWARZ, 2006). No presente estudo, *S. warneri* foi o ECN com maior prevalência de isolamento (30,7%), seguido por *S. pasteurii* (17,8%) e *S. saprophyticus* subesp. *bovis* (15,8%). Quanto ao estudo da sensibilidade antimicrobiana nos ECN, observou-se a resistência a penicilina em 46,4% dos estafilococos coagulase negativos e, quanto a ampicilina, em 47,4% dos estafilococos coagulase negativos.

A resistência a penicilina foi a observação mais frequente observada em trabalho conduzido por Machado et al. (2008), obtendo-se 93,5% das amostras resistentes à droga. No presente trabalho, observou-se também que houve resistência a pelo menos um princípio ativo testado em 61,9% das cepas coagulase negativas, demonstrando que os ECN também são uma preocupação em relação a terapêutica para as mastites em propriedades leiteiras.

Conclusão

As análises microbiológicas do leite de vacas com mastite subclínica apresentou estafilococos coagulase negativos resistentes a pelo menos uma das nove drogas testadas, tendo apresentado alto grau de resistência a ampicilina e ampicilina, o que demonstra que,

além dos ECN serem responsáveis por grandes prejuízos à pecuária leiteira, podem apresentar resistência a diversos antibióticos comumente utilizados em medicina veterinária. Desta forma, torna-se necessário o isolamento e identificação destes agentes para que sejam realizadas as provas de sensibilidade antimicrobiana e uso de terapêutica adequada.

Referências

- BAKER, J.S. Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci. **J. Clin. Microbiol.**, v.19, p.875-879, 1984.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p. 493-496, 1966.
- CUNHA, M.L.R.S.; SINZATO, Y.K.; SILVEIRA, L.V.A. Comparison of Methods for the Identification of Coagulase-negative Staphylococci. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, n.8, p.855-860, 2004.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, W.C.; PROCOPP, G.; WOODS, G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6^o Ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 2008. 1565p.
- LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. **J. Antimicrob. Chemother.** v.57, p. 966-969, 2006.
- MACHADO, T.R.O.; CORREA, M.G.; MARIN, J.M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitic cattle in Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec** 60: 1; 278-282, 2008.
- PYORALA, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. **Vet Microbiol.** 134: 3-8, 2009.
- QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology.** London: Mosby, 1994. 648p.
- SAWANT, A.A.; GILLESPIE, B.E.; OLIVER, S.P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. **Vet Microbiol**, v.134, p.73-81, 2009.
- TAPONEN, S.; SIMOJOKI, H.; HAVERI, M.; LARSEN, H.D.; PYORALA, S. Clinical characteristics and persistence of bovine mastitis caused by different species of coagulase-negative staphylococci identified with API or AFLP. **Vet Microbiol.** 115: 199-207, 2006.

THORBERG, B.M.; KUHN, I.; AARESTRUP, F.M.; BRANDSTROM, B.; JONSOON, P.; NIELSSON-THAM, M.L. Pheno-and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol.* 115: 163-172, 2006.

THORBERG, B.M.; DANIELSOON-THAM, M.L.; EMANUELSON, U.; WALLER, P. Bovine subclinical mastitis caused by different types of coagulase-negative staphylococci. *J. Dairy Sci.* 92: 4962-4970, 2009.