



Identificação Molecular e Perfil de Sensibilidade a Antibióticos Convencionais de Cepas de *Staphylococcus* spp. Isolados de Bovinos

Adriana Gonçalves Freitas, Emanuely Gomes Alves Mariano, Ana Luiza Santos de Oliveira, Cirila Ionara Almeida Araujo, Jocilane Pereira de Oliveira

Introdução

O leite é um alimento natural de grande valor nutritivo com relevante importância na alimentação humana tanto *in natura* quanto matéria prima de produtos [1]. O mercado mundial exige que os alimentos de origem animal sejam seguros. Para isso, torna-se necessário a manutenção de animais sadios no rebanho a fim de assegurar a produção em quantidade e qualidade.

A mastite é considerada a doença que mais onera a produção de leite por elevar o custo com medicamentos. Além de causar alterações físicas e químicas nesse produto com sérios prejuízos aos produtores, à indústria e ao consumidor final. A principal veiculação da doença é por infecção da glândula mamária e o micro-organismo mais frequente é o *Staphylococcus aureus*. Essa bactéria tem apresentado resistência a diversos antimicrobianos comumente utilizados nos tratamentos [2]. Objetivou-se classificar as bactérias por análise molecular e determinar o perfil de sensibilidade à antibióticos convencionais em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite.

Material e métodos

Foram avaliadas a cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e três isolados (S178, S135 e S182) provenientes do úbere de vacas com mastite criadas na fazenda experimental do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG. As cepas foram isoladas realizando coloração de Gram e a utilização do manitol, produção de coagulase, dnase, catalase e crescimento em meio seletivo *Baird-Parker* [3].

Para identificação molecular dos isolados utilizados, foi promovida a extração e amplificação do DNA como descrito por Chapaval *et al.* [4]. Para amplificação foi utilizado um par de *primers* que se anelam em regiões conservadas dos genes 16S e 23S, 16-1^a (5'GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCAT TCGGA 3'). As amostras foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório Myleus Biotechnology. As amostras tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACETM 1000. Os *primers* usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') [5]. O resultado do sequenciamento foi verificado via software SeqScanner, e os resultados foram comparados *online* no BLAST (banco de dados do NCBI). Os isolados foram identificados com nível mínimo de 99% de similaridade.

Os procedimentos para o teste de difusão em ágar foi padronizado de acordo com o NCCLS [6]. Inóculos de cada isolado e a cepa padrão foram preparados com a suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo Ágar para contagem de micro-organismos (PCA) em solução salina estéril. A suspensão foi ajustada com o padrão de 0,5 da escala de McFarland, que correspondeu a aproximadamente 10⁸ UFC/mL. Em placas de Ágar Mueller-Hinton foram inoculados 200 µL do inóculo que foram espalhados com o auxílio de *swabss* estéreis. Sobre a superfície desse meio foram adicionados discos de antibióticos de cloranfenicol 30 mg, eritromicina 15 mg, vancomicina 30 mg, oxacilina 1 mg, gentamicina 10 mg, tetraciclina 30 mg, clindamicina 2 mg e penicilina 10 mg, segundo descrito no NCCLS [7]. As placas foram incubadas a 35°C e após 24 horas os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados em milímetros (mm). Posteriormente, os isolados foram classificados como resistentes ou sensíveis de acordo com o NCCLS [7].

Resultados

A cepa S178 foi classificada como *Staphylococcus aureus*, já as cepas S135 e S182 foram classificadas como *Staphylococcus haemolyticus* com similaridade mínima de 99% (TABELA 1).

As cepas S135 e S182 foram sensíveis a todos antibióticos testados. A cepa S178, a única identificada como *Staphylococcus aureus*, foi sensível apenas ao Cloranfenicol e a Gentamicina. A cepa padrão foi sensível ao Cloranfenicol, a Eritromicina, a Gentamicina e Tetraciclina. O isolado de *Staphylococcus aureus* S178 e a cepa ATCC 25923 foram resistentes aos antibacterianos Vancomicina, Oxacilina, Clindamicina e Penicilina (TABELA 2).



Discussão

Neste trabalho têm-se dois grupos de micro-organismos, a cepa padrão ATCC 25923 e S178 sendo *S. aureus* e as cepas S135 e S182 classificadas como *S. haemolyticus*. Nota-se que os perfis de sensibilidade dos dois grupos de micro-organismos presente na pesquisa foram semelhantes ou próximos, as cepas S135 e S182 apresentaram sensibilidade a todos os antibióticos já a cepa ATCC 25923 e S178 apresentaram resistência aos mesmos antibióticos, o que comprova uma maior resistência aos antimicrobianos do *S. aureus* comparado ao *S. haemolyticus*. Esses resultados podem explicar a baixa prevalência de *S. haemolyticus* em casos de mastite relatados na literatura.

Staphylococcus aureus é um micro-organismo Gram-positivo e se destaca como o mais encontrado nas infecções intramamárias de bovinos no Brasil e no mundo [8]. A prevalência desse micro-organismo como causador da mastite bovina está relacionada aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos [9]. Isso é considerado um grande problema para a sanidade animal, produção e qualidade do leite.

O uso incorreto e indiscriminado desses produtos é um dos principais fatores que influenciam no aumento das taxas de resistência [8]. Os isolados S178, identificados como *S. aureus* foram resistentes à maioria dos antibióticos testados, provavelmente pelo fato da fazenda estudada realizar o rodízio de drogas a fim de evitar esse tipo de problema. Porém, mesmo com esta técnica empregada, com o passar do tempo ainda surgem cepas resistentes.

A sensibilidade de *S. aureus* é bastante variável entre rebanhos e até mesmo dentro de um mesmo rebanho [10]. O conhecimento do perfil de sensibilidade das cepas presentes em cada propriedade aos antibióticos presentes no mercado é fundamental para o efetivo controle da mastite. Entre os antimicrobianos testados o Cloranfenicol e a Gentamicina são os indicados para controle de mastite na fazenda estudada.

Conclusão/Conclusões/Considerações finais

Das três bactérias isoladas neste trabalho, a cepa S178 foi classificada como *Staphylococcus aureus* e as cepas S135 e S182 foram classificadas como *Staphylococcus haemolyticus*. As cepas S135 e S182 são sensíveis a todos antibióticos convencionais testados na pesquisa. Já o isolado S178 foi sensível apenas ao Cloranfenicol e a Gentamicina e resistente a Eritromicina, Vancomicina, Oxacilina, Tetraciclina, Clindamicina e Penicilina. A cepa padrão foi sensível ao Clorafenicol, Eritromicina, Gentamicina e Tetraciclina.

Referências

- [1] LUZ, D. F.; BICALHO, F. A.; OLIVEIRA, M. V. M.; SIMÕES, A. R. P. Avaliação microbiológica em leite pasteurizado e cru refrigerado de produtores da região do Alto Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 4, n. 14, p. 367-374, 2011.
- [2] SANTOS, F. G. B. *et al.* Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. **Revista Napgama**, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.
- [3] HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. Artmed, 2008. 436 p.
- [4] CHAPAVAL, L.; MOON, D.H.; GOMES, J.E.; DUARTE, F.R.; TSAI, S.M. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 1, p. 299-306, 2008.
- [5] REYSENBACH, A.L.; LONGNECKER, K.; KIRSCHTEIN, J. (2000). Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. **Appl Environ Microbiol** 66, 3798-3806.
- [6] NCCLS (2003) **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. [Online]. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Available: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 10 Jul. 2015.
- [7] NCCLS (2005) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. Available: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf>. Acesso em: 10 Jul. 2015.
- [8] COSTA, G. M. *et al.* Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.
- [9] BRITO, M.A.V.P. *et al.* Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *S. aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, n.5, p.10-17, 2001.
- [10] RABELLO, R. F.; *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Sciences**, v. 88, n. 9, p. 3211-3219, 2005.



Tabela 1. Sequenciamento do rRNA 16S e classificação de acordo com o BLAST (Banco de Dados do NCBI) de cepas isoladas de mastite bovina

Isolados	Origem	Nº de nucleotídeos analisados	Identificação com similaridade de 99%
S178	Vaca com mastite	551	<i>Staphylococcus aureus subsp. aureus</i> estirpe NCTC 8325
S135	Vaca com mastite	553	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> estirpe JCSC1435
S182	Vaca com mastite	550	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> estirpe JCSC1435

Tabela 2. Perfil de sensibilidade a antibióticos convencionais de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de bovinos e cepa padrão

Antibacterianos	<i>Staphylococcus</i> spp.			
	S135	S182	S178	ATCC 25923
Cloranfenicol	S	S	S	S
Eritromicina	S	S	R	S
Vancomicina	S	S	R	R
Oxacilina	S	S	R	R
Gentamicina	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	R	S
Clindamicina	S	S	R	R
Penicilina	S	S	R	R

S=Sensível, R=Resistente.