

SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ESTAFILOCOCOS, ISOLADOS DE MASTITE BOVINA NA ZONA DA MATA DE MINAS GERAIS¹

LAERTE FERREIRO² e MAURO TEIXEIRA DE MELO³

RESUMO - Foram realizados 354 antibiogramas com 300 estirpes de *Staphylococcus aureus* e 54 de *S. epidermidis*, através do método de difusão. Das 300 estirpes de *S. aureus*, 165 (55%) eram totalmente susceptíveis aos onze agentes antimicrobianos testados; 67 (22,3%) resistentes à penicilina G (PEN); cinco (1,7%) à tetraciclina (TET); quatro (1,3%) ao cloranfenicol (CLR); duas (0,6%) à estreptomicina (STR) e duas (0,6%) à lincomicina (LIN) in vitro. Resistência múltipla foi constatada em 14,9% das amostras, sendo mais comuns as combinações envolvendo PEN:STR:TET. CLR. De acordo com a fonte de infecção estafilocócica, 259 (86,3%) eram amostras de origem bovina, 29 (9,7%) de origem humana e 12 (4%) de origem canina, sendo as estirpes bovinas bem mais resistentes, exceto para novobiocina, cloxacilina e rifamicina. Em relação às 54 estirpes de *S. epidermidis*, 28 (51,8%) apresentaram susceptibilidade total e 16 (29,6%), resistência múltipla, especialmente combinações de PEN:STR:TET:CLR e sulfisoxazole (SUL). Todas as 354 estirpes testadas foram susceptíveis à rifampicina.

Termos para indexação: susceptibilidade antimicrobiana, mastite bovina, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS AT "ZONA DA MATA" - MG, BRAZIL

ABSTRACT - Three hundred and fifty-four antibiograms were performed with 300 strains of *Staphylococcus aureus* and 54 of *S. epidermidis* using the diffusion method. Among the *S. aureus*, 165 (55%) were completely susceptible to the eleven antimicrobial agents tested; 67 (22,3%) resistant to penicillin G (PEN), 5 (1,7%) to tetracycline (TET), 4 (1,3%) to chloramphenicol (CLR), 2 (0,6%) to streptomycin and 2 (0,6%) to lincomycin in vitro. Multiple resistance was found in about 15% of the isolates, being most common the combinations involving PEN : STR : TET and CLR. According to the source of staphylococcal infection, 259 (86,3%) were strains of bovine origin, 29 (9,7%) human and 12 (4%) canine, being the bovine ones much more resistant except to novobiocin, cloxacillin and rifamycin. Regarding the 54 *S. epidermidis*, 28 (51,8%) showed total susceptibility and 16 (29,6%) multiple resistance, specially combinations of PEN : STR : TET : CLR and Sulfisoxazole (SUL). All 354 strains were susceptible to rifampicin (rifampim).

Index terms: antimicrobial susceptibility, bovine mastitis, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*.

INTRODUÇÃO

O combate a uma doença insidiosa como a mastite bovina, requer, entre outros aspectos, o conhecimento do arsenal antimicrobiano disponível como contrapartida à ação do agente infeccioso e da influência do ambiente na relação hospedeiro-parasita.

É muito útil para o veterinário clínico, que trabalha em condições de campo, sem um auxílio laboratorial constante, ter uma noção prévia do grau de resistência de determinadas espécies que predominam na sua área de atuação. O conhecimento dos padrões de susceptibilidade encontrada, somado à experiência da resposta clínica alcançada em casos anteriores, deve facilitar uma seleção entre os medicamentos disponíveis, notadamente para a terapêutica de casos agudos. Entretanto, ao se utilizar tais informações, deve ser lembrado que especialmente com bactérias, como os estafilococos e as enterobactérias, podem ocorrer, rapidamente, mudanças nos padrões de susceptibilidade, dentro e entre rebanhos previamente estudados.

Para a execução dos antibiogramas, existem três métodos principais: diluição das drogas em caldo,

¹ Aceito para publicação em 22 de dezembro de 1980. Trabalho realizado através da EMBRAPA/CNPGL, Rodovia MG 133, km 42, CEP 36.155 - Coronel Pacheco, MG.

² Méd. Vet., EMBRAPA, à disposição da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Faculdade de Veterinária, Caixa Postal 2.172, CEP 90.000 - Porto Alegre, RS.

³ Méd. Vet. da Companhia Agrícola de Minas Gerais (CAMIG) em convênio com o ILCT/EPAMIG, Rua Tte. Luís Freitas, 116, CEP 36.100 - Juiz de Fora, MG.

em ágar, e difusão em ágar, através de discos impregnados com antimicrobicos. As técnicas de diluição oferecem resultados quantitativos em forma de concentração inibidora mínima (CIM) do agente testado. Para este estudo foi utilizado um método de difusão - o "Kirby-Bauer" - alicerçado em etapas rigorosamente uniformizadas, mas de fácil emprego mesmo em laboratórios não sofisticados. Além disso, Ferreiro & Biberstein (1978) após estabelecerem uma comparação com um método de diluição, encontraram uma excelente correlação, oferecendo, mesmo, o teste aqui empregado, um critério interpretativo talvez mais rigoroso para o uso de antibióticos como penicilina G e ampicilina.

O objetivo deste trabalho foi verificar o grau atual de resistência a micróbios oferecida pelos estafilococos, notadamente o *Staphylococcus aureus*, bactéria predominante na região em estudo, e um dos agentes mastitogênicos de difícil tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material estudado: Foram testadas 300 estirpes de *Staphylococcus aureus* e 54 de *S. epidermidis*, isoladas de mastite bovina clínica e subclínica de rebanhos distribuídos em 27 municípios da zona da Mata de Minas Gerais, e identificadas de acordo com os testes rotineiramente empregados em sua classificação.

2. Identificação da origem das fontes de infecção das estirpes de *S. aureus*: Realizada de acordo com a técnica do ágar cristal violeta, proposta por Meyer (1967) e descrita em detalhes por Fernandes & Ferreiro (1979).

3. Teste de susceptibilidade antimicrobiana: Utilizou-se o método de difusão (alta concentração das drogas em discos individuais), descrito por Bauer et al. (1966), com as modificações sugeridas por Barry et al. (1970) e assim apresentado:

- a. selecionaram-se cinco ou seis colônias isoladas de uma cultura em ágar-sangue (18 - 24 h) que eram inoculadas em 0,5 ml de caldo-cérebro-coração (BHI)⁴ e incubadas a 37°C por quatro a seis horas;
- b. colhem-se, com uma alça calibrada⁵, 0,001 ml do caldo bem misturado;
- c. e misturou-se em 9 ml de uma solução de ágar a 1,5%, mantida a 52°C;
- d. o ágar semeado foi vertido numa placa-de-Petri (150 x 15 mm) contendo 70 ml de Mueller-Hinton ágar⁶ (5 - 6 mm de camada), que já fora pré-aquecida a 37°C;
- e. deixou-se solidificar por aproximadamente 10';

f. então os discos foram aplicados na superfície do ágar com um dispensador⁷;

g. as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 16 a 18 horas sem CO₂;

h. os diâmetros das zonas de completa inibição foram mensurados colocando-se uma régua no verso da placa;

i. os resultados foram comparados com a tabela de critério interpretativo e anotados como S, I ou R.

4. Discos⁶ e concentrações empregados: penicilina (10 u); estreptomomicina (10 mcg); tetraciclina (30 mcg); cloranfenicol (30 mcg); kanamicina (30 mcg); eritromicina (15 mcg); lincomicina (2 mcg); novobiocina (30 mcg); rifamicina (5 mcg); cloxacilina (1 mcg) e sulfisoxazole (2 mg).

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados gerais do quadro de susceptibilidade apresentado pelas 300 estirpes de *Staphylococcus aureus* e 54 de *S. epidermidis*, onde se pode notar uma tendência comum de ambos apresentarem resistência maior aos mesmos antimicrobicos, exceto para a sulfá, à qual os *S. epidermidis* se mostraram bem mais resistentes. Observa-se também que a penicilina é o antimicrobico ao qual as estirpes evidenciaram maior resistência, seguindo-se, em ordem decrescente, STR, TET e CLR. Nenhuma estirpe foi resistente à rifamicina.

Os padrões de susceptibilidade das estirpes de *S. aureus* são apresentadas na Tabela 2, observando-se que 165 (55%) amostras apresentaram susceptibilidade total aos onze antimicrobicos testados, enquanto que 45%, variada combinação de resistência total e parcial ou intermediária, notadamente à PEN, à qual 67 (22,3%) se mostraram resistentes. Cabe salientar que onze (3,7%) estirpes foram resistentes simultaneamente à PEN : STR; dez (3,3%) à PEN : TET e dez (3,3%) como intermediárias no seu grau de resistência ou susceptibilidade à ação da PEN, como destaques entre outros casos de múltipla resistência menos expressivos.

⁴ Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA.

⁵ A.H. Thomas Co., P.O. Box 779, Philadelphia, Pa. 19105, USA.

⁶ BBL, Cockeysville, MD 21030, USA.

⁷ Ítem 60625 da BBL.

TABELA 1. Resultados dos testes de susceptibilidade in vitro dos estafilococos^a isolados de mastite bovina.

Categorias	Agentes antimicrobianos ^b										
	PEN	STR	TET	CLR	LIN	SUL	KAN	ERI	NOV	CLX	RIF
Susceptível	183 (38)	274 (47)	275 (48)	289 (48)	295 (51)	295 (45)	297 (54)	298 (53)	299 (54)	299 (54)	300 (54)
Intermediário	15 (8)	2 (0)	1 (0)	0 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Resistente	102 (8)	24 (7)	24 (6)	11 (6)	3 (3)	4 (9)	2 (0)	2 (1)	1 (0)	1 (0)	0 (0)

^a 300 *Staphylococcus aureus* e 54 *S. epidermidis* (em parênteses)

^b PEN = Penicilina; NOV = Novobiocina;
 STR = Streptomina; CLX = Cloxacilina, e
 TET = Tetraciclina; RIF = Rifamicina
 CLR = Cloranfenicol;
 LIN = Lincomicina;
 SUL = Sulfisoxazole;
 KAN = Kanamicina;
 ERI = Eritromicina;

TABELA 2. Padrões de susceptibilidade de 300 estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite bovina na Zona da Mata de Minas Gerais, no período 1978 - 1979.

Agentes antimicrobianos														Estirpes	
PEN	STR	TET	CLR	LIN	SUL	CAN	ERI	NOV	CLX	RIF	Nº	%			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	165	55			
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67	22,3			
R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	3,7			
R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	10	3,3			
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	3,3			
-	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	5	1,7			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1,3			
R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	4	1,3			
R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	3	1			
I	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,6			
-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,6			
-	-	-	-	R	-	-	-	-	-	-	2	0,6			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(15) ^a	5			

- Susceptível; I Intermediário; R Resistente

^a Corresponde a quinze amostras com diferenças padrões - sobretudo combinações de resistência envolvendo PEN, STR, TET e CLR.

TABELA 3. Susceptibilidade^a dos *Staphylococcus aureus* a cada antimicrobico em relação às origens das estirpes.

Origem ^b	Número de amostras	Totalmente susceptíveis	Antimicrobicos x resistência -												
			PEN	STR	TET	CLR	LIN	SUL	KAN	ERI	NOV	CLX	RIF		
Bovina	259	135 (52%)	98	23	23	10	3	2	2	2	2	2	0	0	0
Humana	29	20 (69%)	3	1	0	0	0	0	2	0	0	1	1	1	0
Canina	12	10 (83%)	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Não foram tabulados os resultados classificados como intermediários.

^b De acordo com a técnica proposta por Meyer, W (1967).

A Tabela 3 mostra a susceptibilidade das estirpes de *S. aureus* de acordo com a origem, observando-se que a grande responsável por esse quadro de resistência seriam as estirpes admitidas como de origem bovina, posto que apenas 52% delas mostraram-se totalmente susceptíveis, embora sem nenhuma resistência à NOV, CLX e RIF, quando comparadas a um total de 69% de estirpes humanas e 83% de caninas.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Sob o ponto de vista da clínica prática, os testes de susceptibilidade deveriam ser usados somente nos casos em que os microrganismos isolados possuam características que dificultem uma previsão da melhor droga a ser testada, como os estafilococos que, segundo Hirsh (1977), teriam as estirpes resistentes selecionadas num ambiente, usualmente através do uso inadequado dos medicamentos.

Este estudo evidencia uma grande resistência das estirpes de *S. aureus* à PEN (34%) e bem mais moderada à STR (8%), TET (8%) e CLR (3,7%) revelando assim um quadro geral bem mais ameno, exceto para PEN, de susceptibilidade percentual equivalente, em comparação aos dados achados por Ferreira (Prelo), o qual, embora com um número bem menos expressivo (36 estirpes oriundas do Rio Grande do Sul), constatou a seguinte situação: PEN (31%); STR (33%); TET (25%) e CLR (19%), também os de resistência mais significativa entre os antimicrobicos então avaliados. Este autor encontrou, ainda, maior expressão na resistência múltipla envolvendo PEN : STR : TET.

Especificamente no que concerne à penicilina, Jasper (1972) conseguiu o crescimento de estirpes estafilocócicas em ágar-sangue após havê-las incubado em concentrações maiores do que aquelas consideradas bactericidas. Estas colônias persistentes - que, segundo Misra et al. (1972), seriam resultantes da indução de formas "L" e responsáveis diretas por falhas no combate a muitas mamites estafilocócicas -, poderiam ter a mesma susceptibilidade das estirpes-mães e originar, por sua vez, outras colônias persistentes.

Ainda que não seja possível uma comparação

direta, por ter sido empregada outra técnica Multodisks, World Health Organization (1961), vale notificar que Cury (1977) encontrou, para um total de 76 bactérias testadas com 16 tipos de antibióticos e cinco quimioterápicos, que a associação ampicilina-gentamicina atuou eficientemente sobre todas as amostras ensaiadas.

Sob outro ângulo de vista, quando a susceptibilidade é analisada de acordo com a origem dos estafilococos (Tabela 3), nota-se que as amostras bovinas, além de predominantes (86,3%), foram bem mais resistentes que as de origem humana (9,7%) e canina (4,0%), as quais apresentaram um quadro mínimo de resistência. Anteriormente, Fernandes & Ferreiro (1979) já haviam identificado as origens de 179 *S. aureus* provenientes de duas bacias leiteiras do Rio Grande do Sul (Porto Alegre e Pelotas), no ano de 1973, encontrando dados semelhantes, ou seja, 87,7% eram estirpes de origem bovina; 6,7% de origem humana e 5,6% de origem canina, sem, entretanto, estabelecerem uma correlação com os resultados dos testes de susceptibilidade.

Um problema zoonótico tem sido levantado através de comunicados sobre a permuta de estafilococos entre pessoas e animais. Moeller et al. (1963) constataram que portadores humanos de estirpes hospedeiras resistentes podem constituir um risco para animais domésticos. Recentemente, Lacey & Devriese (1974) comunicaram que algumas estirpes estafilocócicas isoladas de mastite bovina se assemelham em muito àquelas obtidas de fontes humanas na Bélgica, durante os últimos 17 anos.

Jones & Bennett (1965) observaram que 27% dos retireiros eram portadores nasais de estafilococos de coagulase positiva, 50% dos quais, dotados do mesmo fagótipo e padrão similar de susceptibilidade daquelas estirpes isoladas do leite nas respectivas fazendas. Também Giesecke et al. (1972) encontraram uma pequena proporção de infecção do úbere, causada por estirpes humanas em diferentes áreas geográficas.

Por outro lado, conforme destacam Zinn et al. (1961), vacas leiteiras têm sido apontadas como prováveis fontes de estafilococos resistentes causadores de severas infecções em pessoas.

Fica assim evidenciado que o conhecimento da

susceptibilidade antimicrobiana dos *S. aureus* associado à sua origem é um dado epidemiológico muito útil no tratamento, controle e prevenção desse importante agente causador de mastite.

Trabalhos dessa natureza são necessários em outras bacias leiteiras, com a finalidade de verificar o nível de susceptibilidade atual dos germes ali predominantes em relação aos antimicrobicos usualmente empregados, cientificar-se da evolução de possíveis padrões de resistência direcionadas a estes, e conhecer a potencialidade das drogas recém-introduzidas no combate à mastite.

Deve-se procurar, através de um consenso geral, a adoção de uma técnica-padrão, conforme salienta Cury (1977), que possibilite comparações válidas, e, para tanto, o método "Kirby-Bauer", embora seja freqüentemente referido como um teste qualitativo, na realidade é quantitativo, porque o seu critério interpretativo é baseado nos diâmetros das zonas de inibição, que estão diretamente correlacionadas com as concentrações inibidoras mínimas.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Técnica em Laticínios do ILCT/EPAMIG, Míriam Aparecida de Oliveira Pinto, pela incansável colaboração prestada na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- BARRY, A.L.; GARCIA, F. & THRUPP, L.D. An improved single disc method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing pathogens. *Am. J. Clin. Pathol.*, 53:149-58, 1970.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-6, 1966.
- CURY, R. Sensibilidade de agentes bacterianos encontrados na mastite bovina, no Estado de São Paulo, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo*, 14(2):301-8, 1977.
- FERNANDES, J.C.T. & FERREIRO, L. Identificação das origens das cêpas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina através do teste do ágar cristal violeta (Comunicação científica). *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. Rio G. Sul, Porto Alegre*, 7:189-91, dez. 1979.
- FERREIRO, L. Susceptibility patterns of bovine milk strains of *Staphylococcus aureus* originated from

- herds in USA (CA) and Brazil (RS). Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais, Belo Horizonte. Prelo.
- FERREIRO, L. & BIBERSTEIN, E.L. Comparison between diffusion and dilution methods for testing antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* cultures derived from bovine mastitis. J. Vet. Pharmacol. Therap., 1:273-8, 1978.
- GIESECKE, W.H.; HEEVER, L.W. van den. & DUTOIT, I.J. Staphylococcal mastitis: phage types and patterns of *Staphylococcus aureus* Onderstepoort J. Vet. Res., 39:87-96, 1972.
- HIRSH, D.C. Susceptibility testing. California Vet., 31 (2):10-5, 1977.
- JASPER, D.E. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from bovine mastitis. California Vet., 26(10):12-5, 1972.
- JONES, R.H. & BENNETT, F.W. Bacteriophage types and antibiotic sensitivity of Staphylococci from bovine milk and human nares. Appl. Microbiol., 13:725-31, 1965.
- LACEY, R.W. & DEVRIESE, L. A reservoir of Staphylococcal plasmids in man for cattle? J. Med. Microbiol., 7:XXIII, 1974.
- MEYER, W. Ueber die Brauchbarkeit des Kristallvioletttests zur Differenzierung von *Staphylococcus aureus* Stammen. Z. Med. Mikrobiol. Immunol., 153:158-63, 1967.
- MISRA, P.K.; PANDA, S.N. & MISRA, S.K. In vitro sensitivity of bacteria isolated from bovine mastitis to different antibiotics. Indian J. Anim. Health, 11:51-5, 1972.
- MOELLER, R.W.; SMITH, I.M.; SHOEMAKER, A.C. & THALMA, R.A. Transfer of hospital staphylococci from man to farm animals. J. Am. Vet. Med. Ass., 142:613-7, 1963.
- ZINN, R.D.; ANDERSON, G.R. & SKAGGS, J.W. Staphylococci infections in cattle. J. Am. Vet. Med. Ass., 138:382-6, 1961.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva, Suíça. Standardization of methods for conducting microbial sensitivity test. Washington, 1961. (Report Series, 210).