

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE BETALACTAMASE EM AMOSTRAS DE *STAPHYLOCOCCUS* ISOLADOS DE MASTITE CAPRINA NO SEMIÁRIDO PARAIBANO

F. Garino Junior, E.K.A. Camboim, P.B. das Neves, A.V.V. de Sá, A.P. Almeida

Universidade Federal de Campina Grande, Av. Universitária, s/nº, CEP 58700-970, Patos, PB, Brasil. E-mail: garinofjr@hotmail.com

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* e a produção de betalactamase de 42 amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica caprina. Foram utilizados 14 *Staphylococcus chromogenes*, 10 *S. waneri*, 6 *S. saprophyticus*, 5 *S. aureus*, 3 *S. epidermidis*, 2 *S. intermedius* e 2 *Staphylococcus coagulase negativo*. Os maiores índices de resistência foram para penicilina 66,67% e ampicilina 63,89% e sensibilidade frente à cefoxitina 97,62%. A múltipla resistência a 3 ou mais antimicrobianos foi observada em 42,86% dos isolados. Das 42 amostras de *Staphylococcus* avaliadas, 73,81% foram positivas para o teste de produção de betalactamase. A concentração inibitória mínima apresentou 100% das amostras susceptíveis à norfloxacin e os valores de resistência para os demais antimicrobianos não ultrapassaram os 30%. A alta resistência apresentada para penicilina e ampicilina demonstra a limitação no uso desses antimicrobianos no tratamento da mastite caprina na região. Embora neste estudo as cefalosporinas tenham apresentado boa sensibilidade, o uso desses fármacos em medicina veterinária se torna preocupante devido à incidência de estirpes produtoras de betalactamase.

PALAVRAS-CHAVE: Mastite subclínica, cabras, *Staphylococcus*, resistência antimicrobiana, betalactamase, CIM.

ABSTRACT

SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIAL DRUGS AND PRODUCTION OF BETA-LACTAMASE BY *STAPHYLOCOCCUS* STRAINS ISOLATED FROM MASTITIS IN GOATS IN THE SEMI-ARID REGION OF PARAIBA STATE, BRAZIL. The present study was aimed to test the *in vitro* antimicrobial susceptibility using disc diffusion assay and minimum inhibitory concentration (MIC) values, as well as the production of beta-lactamase of 42 strains of *Staphylococcus* sp. isolated from subclinical mastitis in goats in the semi-arid region of Paraíba state, in Brazil. To this end, 14 samples of negative *Staphylococcus chromogenes*, 10 *S. waneri*, 6 *S. saprophyticus*, 5 *S. aureus*, 3 *S. epidermidis*, 2 *S. intermedius* and 2 *Staphylococcus* were used. Regarding the *in vitro* susceptibility, the highest levels of resistance observed concerned penicillin (66.67%) and ampicillin (63.89%), and the greatest sensitivity observed concerned Cefoxitin (97.22%). Multiple resistance to 3 or more antimicrobial drugs was observed in 42.86% of the isolates. Of the total *Staphylococcus* isolated, 73.81% were positive for the beta-lactamase production test. The minimum inhibitory concentration showed 100% of the samples susceptible to norfloxacin, and the maximum resistance values to the other antimicrobial drugs were 30%. According to the results obtained, it is concluded that, in order to select the most appropriate drug to treat mastitis in goats caused by strains of *Staphylococcus*, the antimicrobial sensitivity profile of the strain must be known and routine laboratory tests for detecting beta-lactamase should be performed because these enzymes are disseminated both in human and veterinary medicine. The high resistance to penicillin and ampicillin demonstrates the limitation in the use of antibiotics in the treatment of mastitis in goats. Although in the present study the cephalosporines demonstrated a considerable degree of sensitivity, the use of these antimicrobial agents in veterinary medicine becomes a matter of concern due to the incidence of strains that produce betalactamase.

KEY WORDS: Subclinical mastitis, goats, *Staphylococcus*, antimicrobial resistance, Betalactamase, MIC.

O gênero *Staphylococcus* engloba os principais agentes etiológicos da mastite caprina. A mastite clínica é causada, principalmente, por *Staphylococcus* coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus*), e a mastite subclínica é produzida, sobretudo, por *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCN), sendo predominantes *S. epidermidis* e *S. chromogenes* (MOTA, 2000; BERGONIER *et al.*, 2003; LANGONI *et al.*, 2006).

Em relação à susceptibilidade *in vitro* dos agentes etiológicos da mastite caprina, tem-se observado a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos convencionais, o que alerta para a necessidade da adoção de protocolos terapêuticos, de preferência respaldados em testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* (LANGONI *et al.*, 2006). Vale salientar a importância desses micro-organismos como agentes de zoonoses, havendo a possibilidade de transmissão para os seres humanos através de leite e derivados (ACHA; SZYFRES, 2001).

Um fator importante na resistência bacteriana é a produção de enzimas que inativam os antimicrobianos. A betalactamase está incluída entre os principais mecanismos de resistência aos betalactâmicos, drogas frequentemente usadas para o tratamento de infecções intramamárias. Essa enzima age no anel betalactâmico, provocando a hidrólise e a inativação do antibiótico. Ela é usualmente encontrada em isolados clínicos do gênero *Staphylococcus* (LIVERMORE, 1995; MEDEIROS, 1997). Numerosos relatos têm enfatizado a necessidade de uma menor e melhor utilização de agentes antibacterianos, melhorias no controle das infecções e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. No entanto, o uso restrito de antibacterianos nem sempre leva à queda na resistência, provavelmente pela adaptação desses micro-organismos em relação ao carreamento da resistência (LIVERMORE, 2003).

São escassos os estudos conduzidos para a investigação do perfil de sensibilidade, produção de betalactamase e verificação da múltipla resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus* isolados de mastite caprina na região. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* pelo método de difusão em disco e concentração inibitória mínima (CIM), bem como a produção de betalactamase em 42 amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido da Paraíba.

Foram utilizadas 42 amostras de *Staphylococcus* isolados de casos de mastite subclínica caprina no semiárido da Paraíba (14 *S. chromogenes*, 10 *S. warneri*, 6 *S. saprophyticus*, 5 *S. aureus*, 3 *S. epidermidis*, 2 *S. intermedius* e 2 *S. coagulase-negativos*), pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) do Campus de

Patos da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Realizou-se o teste de susceptibilidade *in vitro* dos antimicrobianos pelo método de difusão de discos em placas contendo meio àgar Mueller-Hinton (Hi-Media®, Mumbai, Índia) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005). Foram utilizados discos com os seguintes antimicrobianos: ampicilina 30 mcg, cloranfenicol 30 mcg, tetraciclina 30 mcg, oxacilina 1 mcg, amicacina 30 mcg, penicilina 10 UI, norfloxacina 10 mcg, cefalotina 30 mcg, cefoxitina 30 mcg, cefalexina 30 mcg (CECON®, São Paulo, Brasil). A interpretação dos resultados foi realizada com a leitura dos halos de inibição (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2005). Para o teste de controle de qualidade, foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A determinação da CIM foi realizada de acordo com os métodos descritos no CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2005). Os antimicrobianos usados neste estudo foram amoxicilina (0,13-64 mcg/mL), cefalexina (0,13-64 mcg/mL), eritromicina (0,13-64 mcg/mL), norfloxacina (0,13-64 mcg/mL) e tetraciclina (0,13-64 mcg/mL) (Pharma Nostra®, São Paulo, Brasil). Os antimicrobianos foram diluídos em tubos de ensaio contendo caldo Müller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia). Foram inoculados em cada tubo 0,1 mL do inóculo do micro-organismo a ser testado na concentração de 0,5 na escala de McFarland. Os tubos foram incubados a 37° C por 20-24 horas. Após o período de incubação, foi realizada a verificação da inibição do crescimento, definida como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os valores são apresentados em CIM₅₀ e CIM₉₀ para inibição de crescimento de 50% e 90%, respectivamente. Os resultados foram interpretados conforme as normas do CLSI (2005). Como controle, foi utilizada uma amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Todos os *Staphylococcus* foram testados para a produção de betalactamase através do método da cefalosporina cromogênica em disco (Cefinase®, BD- Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA), que apresenta uma mudança da cor amarela para a vermelha quando o anel betalactâmico é hidrolisado. As culturas testadas tinham 24 horas de incubação e foram removidas usando-se alça de platina, tendo sido aplicadas sobre a superfície do disco de cefinase e observadas por um período de uma hora. O desenvolvimento da cor vermelha foi considerado como reação positiva, indicando produção de betalactamase. Para o controle positivo, foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

Os resultados dos testes de susceptibilidade *in vitro* dos *Staphylococcus* frente aos antimicrobianos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Susceptibilidade das 42 amostras de *Staphylococcus* de mastite caprina no semiárido paraibano. Paraíba, Brasil, 2009.

Antimicrobianos	Resistência %	Intermediário %	Sensibilidade %
Cefoxitina 30 mcg	0	2,38	97,62
Amicacina 30 mcg	4,76	4,76	90,48
Cefalotina 30 mcg	9,52	2,38	88,1
Cefalexina 30 mcg	4,76	9,52	85,72
Cloranfenicol 30 mcg	9,52	4,76	85,72
Norfloxacin 10 mcg	14,28	2,39	83,33
Oxacilina 1 mcg	4,76	11,91	83,33
Tetraciclina 30 mcg	38,09	2,38	59,53
Ampicilina 30 mcg	63,89	0	36,11
Penicilina 10 UI	66,67	0	33,33

Verificou-se maior índice de sensibilidade à cefoxitina (97,62%), seguida pela amicacina e pela cefalotina (90,48%). A cefoxitina foi o único antimicrobiano que apresentou eficácia acima de 90%. Também apresentaram boa sensibilidade, variando entre 80% e 90%, os antimicrobianos cloranfenicol, oxacilina, amicacina, norfloxacin, cefalotina e cefalexina.

Os maiores índices de resistência das amostras foram à penicilina e à ampicilina (66,67% e 63,89%, respectivamente). Resultados similares foram obtidos por LANGONI *et al.* (2006), que observaram resistência frente à penicilina em amostras de *S. epidermidis* e *S. aureus* (61,5% e 87,5%, respectivamente) isolados de mastite caprina. Para a ampicilina, os mesmos autores verificaram resistência para os mesmos agentes, com índices de 63,2% e 75%, respectivamente. Em um estudo realizado no Nordeste do Brasil, SILVA *et al.* (2004) obtiveram índices de resistência de 60% para *Staphylococcus* coagulase-negativos.

Os resultados do presente estudo corroboram com os obtidos por SILVA *et al.* (2004) e LANGONI *et al.* (2006). Entretanto, em um trabalho realizado por MERCIER; PELLET (2003) com amostras de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite caprina na França, foi observada baixa resistência à penicilina (19,4%) e sensibilidade à ampicilina (100%). A diferença entre a sensibilidade observada nesse estudo e a resistência verificada no presente trabalho frente à ampicilina e à penicilina pode estar associada ao uso indiscriminado ou mesmo à subdosagem dos dois antibióticos na terapia da mastite caprina na região. Os mesmos autores alertam sobre o problema do uso prolongado de determinados antimicrobianos, como a penicilina, a diidroestreptomicina e a espiramicina, que apresentaram índices elevados de resistência e que são comumente utilizados no tratamento de mastite caprina.

É importante ressaltar que o uso inadequado de antimicrobianos favorece a redução da sua eficácia. Por isso, o ideal é que o protocolo terapêutico seja baseado em exames laboratoriais, objetivando-se evitar resistência bacteriana.

Outro fator verificado no presente estudo foi a presença de múltipla resistência a dois ou mais antimicrobianos. Esses resultados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados de 42 amostras de *Staphylococcus* que apresentaram múltipla resistência. Paraíba, Brasil, 2009.

Resistência	Nº	%
2 Antimicrobianos	8	19,05
3 Antimicrobianos	12	28,57
4 Antimicrobianos	4	9,52
5 Antimicrobianos	1	2,38
7 Antimicrobianos	1	2,38
Total	26	61,90

A presença de múltipla resistência a antimicrobianos nas amostras de *Staphylococcus* testadas teve como padrão mais frequente a resistência a três antimicrobianos (28,57%), seguida pela resistência a dois antimicrobianos (19,05%). Um *Staphylococcus* (2,38%) apresentou resistência a sete antimicrobianos. Esse achado representa um motivo de preocupação, uma vez que muitos antimicrobianos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre tais microorganismos, fato que poderia acarretar enorme dificuldade no tratamento dos animais doentes e, conseqüentemente, agravar as perdas econômicas. MERCIER; PELLET (2003) verificaram múltipla resistência a até quatro antimicrobianos em 27% das 62 amostras de *Staphylococcus* avaliadas. Os mesmos autores encontraram uma amostra resistente a cinco diferentes antimicrobianos. Esse fato demonstra que a múltipla resistência é um evento comum em isolados de mastite caprina e, principalmente, resistência simultânea à penicilina e à ampicilina.

A elevada prevalência de amostras com resistência simultânea à penicilina e à ampicilina também foi observada neste trabalho (valores acima de 60%), o que pode estar associado ao uso frequente ou mesmo sub dosagens desses betalactâmicos na terapia da mastite e de outras enfermidades no rebanho.

Tabela 3 - Concentração Inibitória Mínima para as 42 amostras de *Staphylococcus* de mastite caprina. Paraíba, Brasil, 2009.

Antimicrobianos	Ponto de corte ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ₅₀ %	CIM ₉₀ %	Resistência %
Amoxicilina	≥ 16	0,5	>64	28,5
Cefalexina	≥ 32	2	>64	11,9
Eritromicina	≥ 8	2	>64	16,7
Norfloxacina	≥ 16	1	4	0,0
Tetraciclina	≥ 16	0,5	32	19,0

Em relação à produção de betalactamase, verificou-se que 73,81% das amostras analisadas foram positivas ao teste. Estudos relacionados à produção de betactamase em *Staphylococcus* isolados de mastite caprina são escassos. BRITO *et al.* (2001), analisando 112 amostras de *S. aureus* isolados de mastite bovina no Estado de Minas Gerais, verificaram que 41,96% dos isolados foram positivos para a produção de betalactamase. Entretanto, um estudo realizado na Itália por MORONI *et al.* (2005), em 28 amostras de *S. aureus* isolados de mastite caprina, verificou que todos os isolados eram negativos para a produção de betalactamase. Este fato pode estar relacionado pelas diferenças geográficas e tecnológicas e pelo uso terapêutico prudente de antimicrobianos no referido país. Como observado neste trabalho, os maiores índices de resistência foram à penicilina e à ampicilina. Vale salientar que os antibióticos betalactâmicos estão entre os mais usados em medicina veterinária (BRINHAS *et al.*, 2002) e que amostras de *Staphylococcus* apresentam, como principal mecanismo de resistência a esse grupo de antimicrobianos, a produção da enzima betalactamase (BRADFORD, 2001). O alto índice de resultados positivos encontrados para a produção de betalactamase reflete o problema do uso inadequado de betalactâmicos, favorecendo o aparecimento de estirpes resistentes, principalmente as produtoras de betalactamase.

Na Tabela 3, são apresentados os valores da concentração inibitória mínima dos antimicrobianos frente a *Staphylococcus*. Nas colunas CIM₅₀ e CIM₉₀, são mostradas as menores concentrações ($\mu\text{g/mL}$) que inibiram 50% e 90% das amostras de *Staphylococcus*, respectivamente.

Dos 42 *Staphylococcus* avaliados, apenas um (2,3%) foi suscetível a todos os antibióticos testados, e cinco (11,9%) foram resistentes a três ou mais antimicrobianos até a maior concentração estudada. Pode-se observar que 100% das amostras foram suscetíveis à norfloxacina.

Verificou-se que a maioria das estirpes apresenta suscetibilidade aos antimicrobianos testados. A indicação terapêutica deve levar em consideração os valores obtidos pelas CIM, pois o tratamento deve proporcionar níveis de antimicrobiano maiores do que a CIM no local da infecção. Com essa informação, o veterinário clínico poderá realizar a terapia de maneira correta, de modo a alcançar os benefícios

esperados, tanto para a saúde do animal como para o controle da enfermidade (BRITO *et al.*, 2001).

Os resultados de sensibilidade aos antibióticos obtidos neste trabalho fornecem dados importantes em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos frente aos *Staphylococcus* avaliados na região, podendo dar suporte na escolha do antimicrobiano adequado para tratamento de mastite caprina bem como auxiliar no controle dessa enfermidade na região.

A alta resistência apresentada à penicilina e à ampicilina observada neste trabalho demonstra a limitação ao uso desses antibióticos no tratamento da mastite caprina na região. Embora neste estudo as cefalosporinas tenham apresentado boa sensibilidade, o uso desses antimicrobianos na terapia em medicina veterinária se torna preocupante devido à incidência de estirpes produtoras de betalactamase.

Outro fator importante observado neste estudo foi a presença de estirpes de *Staphylococcus* multirresistentes, uma vez que a múltipla resistência aos antimicrobianos pode dificultar a escolha do medicamento na terapia desses micro-organismos, além ser potencialmente transmitidos ao homem através do leite e derivados.

Os resultados obtidos revelam também a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, assim como a inclusão do teste de produção de betalactamase na rotina de laboratório, principalmente em medicina veterinária, uma vez que essas enzimas estão presentes em isolados clínicos de humanos e animais.

REFERÊNCIAS

- ACHA, N.P.; SZYFRES, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3.ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 2001. v.1, 398p.
- BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R., RUPP R., LA-GRIFFOUL G., BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminant. *Veterinary Reserch*, v.34, p.689-716, 2003.
- BRADFORD, P.A. Extended-Spectrum beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRIÑAS, L.; ZARAZAGA, M.; SAÉNZ, Y.; RUIZ-LARREA, F.; TORRES, C. β -Lactamases in Ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemother.*, v.46, p.3156-3163, 2002.

BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; SILVA, M.A.S.; CARMO, R.A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.5, p.531-537, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement*. Pennsylvania: CLSI, 2005. (Document M100-S15).

LANGONI H.; DOMINGUES P.F.; BALDINI S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.13, n.1, p.51-54, 2006.

LIVERMORE, D.M. β -lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.8, n.4, p.557-584, 1995.

LIVERMORE, D.M. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases*, v.36, p.11-23, 2003. Supplement 1.

MEDEIROS, A.A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of

beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, p.19-45, 1997. Supplement 1.

MERCIER, P.; PELLET, M.P. Évolution de l'antibiorésistance de souches de *Staphylococcus aureus* d'origine caprine en France. *Revue Médicine. Vétérinaire*, v.154, n.4, p. 277-280, 2003.

MORONI, P.; PISONI, VIMERCATI, C.; RINALDI, M.; CASTIGLIONI, B.; CREMONESI, P.; BOETTCHER, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolated from Chronically Infected Dairy Goats. *Journal of Dairy Science*, v.88, p.3500-3509, 2005.

MOTA, R.A.; DE CASTRO, F.J.C.; SILVA, L.B.G. da; OLIVEIRA, A.A.F. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das bactérias isoladas do leite de cabras com mastite procedentes da Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. *A Hora Veterinária*, v.19, p.26-29, 2000.

SILVA, E.R. da; AMANDA PIMENTA SIQUEIRA, A.P.; DIAS MARTINS, J.C.; FERREIRA, W.P.; NIVALDO DA SILVA. Identification and *in vitro* antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research*, v.55, p.45-49, 2004.

Recebido em 12/5/10

Aceito em 3/12/10