



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CAMILA PEREIRA DA SILVA

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus* spp
ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS NO AGRESTE
PARAIBANO

AREIA

2021

CAMILA PEREIRA DA SILVA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus spp*
ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS NO AGRESTE
PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano. Orientação: Dr. Artur Cezar De Carvalho Fernandes.

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586p Silva, Camila Pereira da.

Perfil de resistência à antimicrobianos em
Staphylococcus spp. isolados de mastite em bovinos
leiteiros no Agreste paraibano. / Camila Pereira da
Silva. - Areia:UFPB/CCA, 2021.

41 f. : il.

Orientação: Artur Cezar de Carvalho Fernandes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Antimicrobianos. 3. Mastite
Bovina. 4. Meticilina. 5. Staphylococcus sp. I.
Fernandes, Artur Cezar de Carvalho. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)

CAMILA PEREIRA DA SILVA

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus* spp
ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS NO AGRESTE
PARAIBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano.

APROVADA EM 23/08/2021

BANCA EXAMINADORA

BANCA EXAMINADORA

Artur Cezar de C. Fernandes

DR. ARTUR CEZAR DE CARVALHO FERNANDES - UFPB

Orientador

Alexandre José Alves
Prof. Dr. Alexandre José Alves
DCV/CCA/UFPB
SIAPE: 336847-1

DR. ALEXANDRE JOSÉ ALVES -- UFPB

Examinador

Fernando Nogueira de Souza

DR. FERNANDO NOGUEIRA DE SOUZA - UFPB

Examinador

Dedicatória:

*Aos meus pais e as minhas irmãs, pelo
encorajamento, amor e confiança que sempre depositaram em mim. Sem
você, eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Artur Fernandes, por sua orientação neste trabalho, e ao longo dos últimos anos, e sua grande contribuição para o meu crescimento profissional. Por ter sido não apenas um professor incrível, mas também uma inspiração e um exemplo a seguir. Quando a pandemia trouxe medo e insegurança para finalização deste projeto, o mesmo se manteve presente, prestativo e otimista. Com compreensão e sensibilidade, me aconselhou e apoiou no momento mais importante da minha vida profissional e pessoal. Ao senhor, professor Artur, toda a minha gratidão.

Aos alunos do curso de medicina veterinária, Ewerton Lima, Raphael Ordonho e Clebson de Sales, cuja ajuda na realização das coletas e processamento das amostras no laboratório foi essencial para o andamento e finalização deste projeto.

Ao coordenador do programa de pós-graduação em ciência animal prof. dr. Ricardo Lucena e aos alunos da pós-graduação, pela caminhada harmoniosa.

A Josênio, secretário do programa de pós-graduação em ciência animal, por todo auxílio, atenção e paciência.

Ao dr. Fernando Nogueira e ao professor Alexandre Alves, por aceitarem fazer parte desta banca e pelas contribuições que farão ao meu trabalho.

A todos os criadores das regiões visitadas que com confiança cederam os animais para coleta de material para o estudo.

A todos os integrantes da equipe do laboratório de medicina veterinária preventiva do hospital veterinário da UFPB que auxiliaram durante a realização deste projeto, em especial aos residentes Claudio Monteiro e Vinicius Tome, e a técnica Maria Eduarda.

A minha família e amigos que torceram por esta conquista e cujo incentivo e carinho a mim oferecidos tornaram esse percurso mais ameno.

Muito obrigada!

RESUMO GERAL

Os *Staphylococcus* spp. destacam-se como os agentes etiológicos mais frequentes da mastite bovina, apresentando elevados níveis de resistência aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, limitando assim, a escolha do antibiótico para o tratamento. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar o perfil de resistência de *Staphylococcus* spp a diferentes classes de antimicrobianos e avaliar fenotipicamente a ocorrência de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina e resistência causada por bomba de efluxo em isolados de infecções mamárias de bovinos leiteiros na região Agreste da Paraíba, Brasil. Foram coletadas 326 amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica que foram submetidas ao exame microbiológico para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp. Para o estudo da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus* spp aos antimicrobianos foi empregada a técnica de difusão em discos frente aos principais antibióticos utilizados para tratamento desta enfermidade na região. Para avaliar resistência à meticilina foi utilizado o teste de disco difusão em ágar MH com cefoxitina (30 mcg) e Oxacilina (1mcg) e para detecção fenotípica de sistema de efluxo foi utilizado teste de disco difusão em ágar MH com norfloxacin (10 mcg). Das 326 amostras de leite analisadas, foram isoladas cepas de *Staphylococcus* spp. em 60 amostras, sendo 83,3% (50/60) *S. aureus*, 8,33% (5/60) *S. chromogenes*, 5% (3/60) *S. epidermidis* e 3,33% (2/60) *S. sciuri*. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos apontaram pouca variação nos perfis de resistência dos isolados. Isolados resistentes a penicilina sensíveis às demais drogas testadas constituíram o padrão de resistência predominante. Todos os isolados estudados foram sensíveis a oxacilina e cefoxitina, exceto em 5 cepas de *S. aureus*, 1 cepa de *S. chromogenes* e 1 cepa de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a oxacilina e 2 cepas de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a cefoxitina, sendo consideradas fenotipicamente resistentes a meticilina. A detecção fenotípica de sistema de efluxo não foi observada neste estudo, uma vez que todas as amostras de *Staphylococcus* sp. avaliadas foram sensíveis a norfloxacin. O fenômeno da múltipla resistência aos antimicrobianos não foi observado neste estudo, no entanto, a detecção fenotípica de MRSA é preocupante e métodos moleculares devem ser utilizados para melhor investigação.

Palavras-chave: antimicrobianos; resistência; *Staphylococcus* sp; mastite bovina; meticilina.

ABSTRACT

Staphylococcus spp. stand out as the most frequent etiological agents of bovine mastitis, with high levels of resistance to antimicrobials, especially to beta-lactams, thus limiting the choice of antibiotics for treatment. Thereby, this study aimed to determine the resistance profile of *Staphylococcus* spp to different classes of antimicrobials and to phenotypically evaluate the occurrence of *Staphylococcus* spp. resistant to methicillin and resistance caused by efflux pump in isolates of bovine mastitis in the state of Paraíba, Brazil. 326 milk samples from cows with clinical and subclinical mastitis were collected and submitted to microbiological examination for isolation and identification of *Staphylococcus* spp. To study sensitivity and resistance of *Staphylococcus* spp to antimicrobials, the disk diffusion technique was used against the main antibiotics used to treat this disease in the region. To assess resistance to methicillin, the disk diffusion test on MH agar with cefoxitin (30 mcg) and oxacillin (1mcg) was used, and for phenotypic detection of the efflux system, the disk diffusion test on MH agar with norfloxacin (10 mcg) was used. Of the 326 milk samples analyzed, 60 strains of *Staphylococcus* spp. were isolated, being 83.3% (50/60) *S. aureus*, 8.33% (5/60) *S. chromogenes*, 5% (3/60) *S. epidermidis* and 3.33% (2/60) *S. sciuri*. Antimicrobial susceptibility tests showed little variation in the isolates' resistance profiles. Isolates resistant to penicillin sensitive to the other drugs tested constituted the predominant resistance pattern. All isolates studied were sensitive to oxacillin and cefoxitin, except for 5 strains of *S. aureus*, 1 strain of *S. chromogenes* and 1 strain of *S. epidermidis*, which showed resistance to oxacillin and 2 strains of *S. epidermidis*, which showed resistance cefoxitin, being considered phenotypically resistant to methicillin. The phenotypic detection of efflux system was not observed in this study, since all *Staphylococcus* sp. evaluated were sensitive to norfloxacin. The phenomenon of multiple antimicrobial resistance was not observed in this study, however, the phenotypic detection of MRSA is a concern and molecular methods should be used for better investigation.

Keywords: antimicrobials; resistance; *Staphylococcus* sp; bovine mastitis; methicillin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa dos municípios incluídos no estudo para avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina no Estado da Paraíba.

Figura 2. Probabilidade da presença de isolados no leite de vacas com mastite, em condições de clínica (A) e subclínica (B), no Agreste Paraibano.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Prevalência de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de rebanhos leiteiros na região do Agreste Paraibano.

Tabela 2. Qui-Quadrado da razão de verossimilhanças para testar a sensibilidade dos diferentes isolados a diferentes antibióticos com base na razão das frequências observadas para as esperadas.

Tabela 3. Sensibilidade (probabilidade) dos isolados do leite de vacas com mastite aos diferentes antibióticos.

LISTA DE ABREVIações

MRS - *Staphylococcus* spp. Resistente à Meticilina

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina

CCS - Contagem de Células Somáticas

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

CIM - Concentração Inibitória Mínima

SCCmec - Staphylococcal Cassette Chromosome mec

PBP - Penicilin-Binding-Protein

SMR - Small Multidrug Resistance

RND - Resistance-Nodulation Division

ABC - Adenosine Binding Cassette

ATP - Adenosine Triphosphate Cassette

MFS - Major Facilitator Superfamily

MATE - Multidrug And Toxic Compound Extrusion

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REFERÊNCIAS.....	12
3. CAPÍTULO 1.....	14
3.1. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.2.REFERÊNCIAS.....	20
4. CAPÍTULO 2.....	27
4.1.ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	28
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	29
RESULTADO E DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÕES.....	38
AGRADECIMENTOS.....	38
CONFLITOS DE INTERESSE.....	38
REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

Nos sistemas de produção de alimentos e de animais, a mastite é a enfermidade mais comum, e com significativo efeito sobre a bovinocultura leiteira. Uma variedade de bactérias pode ser isolada de bovinos com mastite, sendo as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. os principais agentes etiológicos da mastite bovina e são frequentemente resistentes aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, limitando assim, a escolha do antibiótico para o tratamento (COELHO et al., 2009).

A terapia antimicrobiana é implementada na prevenção e controle da mastite (SAINI et al., 2012), porém o uso indiscriminado de antimicrobianos ou a sua utilização de forma exagerada, aumenta o risco de seus resíduos no leite. Isso contribui para a contaminação do ambiente e com o surgimento de cepas resistentes às drogas de importância para a saúde humana, a exemplo de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina (MRS) (SILVA et al., 2018). Apesar da meticilina não ser geralmente utilizada no tratamento de mastites, cepas de MRS têm sido identificadas em fazendas leiteiras (MOON et al., 2007; LIM et al., 2013; PATERSON et al., 2014). A transmissão horizontal de MRS entre bovinos leiteiros e trabalhadores das fazendas já foi relatada (JUHÁSZ-KASZANYITZKY et al., 2007), sugerindo que o contato entre seres humanos e animais e vice-versa pode favorecer a transmissão de tais cepas (LIM et al., 2013). Além disso, a resistência a meticilina confere uma resistência virtual a praticamente todos os beta-lactâmicos, exceto às cefalosporinas de última geração, fato que dificulta o tratamento em casos de infecções (PEACOCK; PATERSON, 2015). O primeiro relato de infecções por MRS em animais foi um caso de mastite bovina na Bélgica no início da década de 1970. Subsequentemente, um número crescente de relatos foram publicados sobre a infecção e a colonização por MRS em animais de companhia e de produção, mostrando sua grande importância na medicina veterinária e na saúde pública (AIRES DE SOUSA, 2017). Para detecção rotineira da resistência a meticilina, os testes de disco difusão são os mais utilizados (MIMICA; MENDES, 2007). Fenotipicamente a resistência a meticilina pode ser identificada por meio dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos sendo a cefoxitina e/ou a oxacilina as drogas de eleição (CLSI, 2008). A nível molecular é possível identificar MRS utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por meio da amplificação dos genes *mecA* e *mecC* (SILVA et al., 2018). A PCR atualmente é a técnica de maior utilização para detecção de MRS, pois baseia-se na

amplificação de DNA gerando resultados confiáveis e diminuindo o risco da identificação de falsos negativos (CHANDRASEKARAN et al., 2014).

A ação de bombas de efluxo compõem um outro mecanismo de resistência antimicrobiana. Genes presentes no cromossomo bacteriano podem explicar a resistência inerente de algumas espécies bacterianas a grupos específicos de antimicrobianos (SINGH et al., 2002), com ênfase para tetraciclinas, macrolídeos e fluoroquinolonas. Além disso, esta mesma atividade de efluxo pode estar associada à diminuição da suscetibilidade a antimicrobianos adicionais, como biocidas e corantes (COSTA et al., 2011), destacando o potencial das bombas de efluxo para transmitir um fenótipo de multirresistência para cepas de *S. aureus*.

Em geral, o surgimento e transferência de bactérias resistentes a antimicrobianos ou determinantes genéticos de animais para populações humanas através da cadeia alimentar é uma preocupação crescente (SAINI et al., 2012). No região nordeste do Brasil, especialmente no Agreste Paraibano, pouco se conhece sobre o perfil de resistência aos antimicrobianos nos rebanhos bovinos e sobre a existência de casos de mastite causados por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e por ação de bombas de efluxo, demonstrando a necessidade da realização de estudos que venham a contribuir para a epidemiologia da infecção por esses patógenos. Esta dissertação está organizada em dois capítulos: primeiro, o referencial teórico sobre mastite bovina e resistência antimicrobiana por *Staphylococcus* spp. e segundo, o artigo científico submetido a revista Acta Veterinária Basílica sobre o perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp isolados de leite de vacas com mastite no Agreste Paraibano.

2. REFERÊNCIAS

AIRES DE SOUSA, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, p. 373-380, 2017.

CHANDRASEKARAN, D. et al. A study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 356-361, 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3rd ed. M31-A3. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.

COELHO, S. M. O. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p. 369-374, 2009.

COSTA, S. S. et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 241, 2011.

JUHÁSZ-KASZANYITZKY, É. et al. MRSA transmission between cows and humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 630-632, 2007.

LIM, S.K. et al. Transmission and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk, environment and workers in dairy cattle farms. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v. 10, n. 8, p. 731-736, 2013.

MIMICA, M. J.; MENDES, C. M. F. Laboratory diagnosis of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n.6, p. 399-406, 2007.

MOON, J.S. et al. Phenotypic and genetic antibiogram of methicillin resistant *staphylococci* isolated from bovine mastitis in Korea. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 3, p. 1176-1185, 2007.

PATERSON, G. K.; HARRISON, E. M.; HOLMES, M. A. The emergence of mecC methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 42-47, 2014.

PEACOCK, S. J.; PATERSON, G. K. Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Annual review of Biochemistry**, v. 84, p. 577-601, 2015.

SAINI, V. et al. Antimicrobial resistance profiles of common mastitis pathogens on Canadian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, 2012.

SILVA, J. G. et al. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 2, 2018.

SINGH, R. et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1680-1685, 2012.

3. CAPÍTULO 1

3.1.REFERENCIAL TEÓRICO: MASTITE BOVINA E RESISTÊNCIAANTIMICROBIANA POR *Staphylococcus* spp.

A mastite é uma das doenças infecciosas mais comuns e dispendiosas na bovinocultura leiteira em todo o mundo (BARKEMA et al., 2009). Não apenas pela redução expressiva da produção, mas também pelo descarte e perda de qualidade do leite e dos derivados lácteos, e sobretudo, pela dificuldade de controle nos rebanhos, associados principalmente a tratamentos inadequados, como o uso indiscriminado de antimicrobianos (SANTOS, 2017). Em função da intensidade dos sinais clínicos, a mastite é classificada em clínica ou subclínica. A forma clínica apresenta os sinais característicos de inflamação, tais como o edema, hipertermia, endurecimento e dor da glândula mamária e/ou aparecimento de grumos, pus ou outras alterações das características do leite. A mastite subclínica se caracteriza por alterações na composição do leite, mas sem manifestações clínicas evidentes. Entre as principais alterações do leite, destacam-se o aumento da contagem de células somáticas (CCS), o aumento dos teores de cloro e de sódio, aumento das proteínas séricas e diminuição dos teores de caseína, gordura, sólido total e lactose do leite. A enfermidade reduz a produção leiteira, chegando em muitos casos a causar perda de um ou mais quartos mamários (TOZZETI et al., 2008).

Um grupo diversificado de microrganismos tem sido reportado à mastite bovina, que incluem bactérias, leveduras e fungos filamentosos. A incidência de infecções virais, micoplasmas e fungos relacionados a mastite também são relatados, porém com menores incidências. Na literatura afirma-se que esta enfermidade pode ser causada por aproximadamente 137 espécies de microrganismos pertencentes a 35 gêneros, sendo as infecções por bactérias as mais prevalentes (CAPURRO et al., 2010; KEEFE, 2012). Do ponto de vista etiológico, a mastite é classificada em dois grupos: contagiosa e ambiental. Os agentes contagiosos vivem e se multiplicam sobre ou dentro da glândula mamária e sua transmissão ocorre de animal para animal ou de teto para teto durante a ordenha. Os agentes ambientais vivem no meio onde os animais são criados e a infecção das glândulas ocorre no período entre as ordenhas. A mastite por agentes ambientais instala-se quando a imunidade do hospedeiro está comprometida ou quando as condições higiênicas sanitárias não são favoráveis (OLIVER et al., 2004; KULKARNI; KALIWAL, 2013).

Os principais agentes da mastite ambiental são bactérias gram-negativas e espécies

do gênero *Streptococcus*. Dentre as bactérias gram-negativas mais comumente associadas às mastites bovinas está o grupo coliformes, com destaque para *Escherichia coli* (FONSECA; SANTOS, 2001). Os *Staphylococcus* spp. são os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite bovina contagiosa, associadas as formas clínicas e/ou subclínicas da infecção (BRITO et al., 2002; SANTOS et al., 2003; RABELLO, 2003; SILVA, 2008) e neste gênero, a espécie *S. aureus* é mais prevalente em infecções de vacas leiteiras (BRITO et al., 2001). Outras espécies de *Staphylococcus* como *S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. chomogenes*, *S. xylosus* e *S. haemolyticus* também podem causar reações inflamatórias na glândula mamária, no entanto, são consideradas agentes secundários por provocarem poucas alterações no úbere e no leite ordenhado de animais infectados, mas podem causar grandes perdas em situações de prevalências elevadas (THORBERG, 2008).

O gênero *Staphylococcus* pertence a família *Staphylococcaceae* e está distribuído no ambiente, fazendo parte da microbiota da mucosa e pele de mamíferos. São bactérias consideradas cocos gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, de metabolismo fermentativos com produção de ácido e não gás, catalase-positivos e capazes de crescer em meios contendo 10% de cloreto de sódio. São microrganismos mesófilos, com temperatura ótima de crescimento de 30 – 37° C, pH na faixa de 4-10, com diâmetro variando de 0,5 a 15 µm, não formadores de esporos, resistentes a bacitracina. Suas células podem ser visualizadas por meio de microscopia óptica como cocos isolados, aos pares, tétrades, pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou em arranjos irregulares em forma de cachos. As colônias são geralmente opacas ou podem ter tonalidade branca, creme e, algumas vezes, podem variar de amarelo à laranja (MURRAY et al., 2006). Os estafilococos são divididos em duas categorias: *Staphylococcus* coagulase negativo, que geralmente compõem a microbiota natural dos seres humanos e animais, e positivo que apresentam maior potencial patogênico, tendo como principal representante *Staphylococcus aureus* (NEVES et al., 2007). Essa classificação baseia-se na capacidade do microrganismo coagular o plasma, sendo considerado um importante fator de patogenicidade dos estafilococos.

Conhecer os principais agentes microbianos envolvidos nos casos de mastite é de suma importância para o controle desta enfermidade, que deve ter como base as medidas terapêuticas e de prevenção. O tratamento de eleição para a mastite bovina é a antibioticoterapia, a qual auxilia as defesas do animal para eliminação do agente invasor. Por sua vez, os microrganismos muitas vezes procuram anular a resposta de defesa do

hospedeiro, bem como de antimicrobianos, utilizando-se dos mais diversos mecanismos de resistência, os quais tem sido alvo de amplos estudos (SILVA, 2008).

Staphylococcus spp. se destacaram, ao longo do tempo, como microrganismos com grande capacidade de desenvolver resistência antimicrobiana, seja por via enzimática, modificação metabólica ou estrutural (MATHUR; SINGH, 2005; GIEDRAITIENĖ et al., 2011). Tal fato é notável ao se observar que pouco tempo após o início do uso clínico da penicilina, em meados da década de 40 do século passado, começaram a surgir as primeiras cepas de *S. aureus* resistentes a esse antimicrobiano. Essa resistência foi atribuída à ação de uma enzima hidrolítica, na época, denominada penicilinase e, mais tarde, chamada de betalactamase (VENTOLA, 2015). Como alternativas para tratar o crescente número de infecções causadas por cepas resistentes à penicilina, no início da década de 60, surgiram as penicilinas sintéticas, como meticilina e oxacilina, antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos assim como a penicilina. Entretanto, ainda no início da década foram registrados os primeiros isolados de MRSA na Europa e, posteriormente, no mundo inteiro (GREMA, 2015), principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs), onde a taxa de infecção por MRSA pode ser superior a 50% (ASLAM et al., 2013; CHO et al., 2017).

Os Beta-lactâmicos são uma classe antimicrobiana que possuem considerável importância clínica em razão da sua elevada eficácia terapêutica, e são comumente utilizados no tratamento das infecções estafilocócicas. O mecanismo de ação dessa classe é determinado pelo anel beta-lactâmico através da inibição da síntese de peptidoglicanos. Este fato lhe confere também a baixa toxicidade, uma vez que sua atuação é sobre um componente da parede celular das bactérias, que não é encontrado em células eucarióticas (AZEVEDO, 2014).

Diversas formas de resistência antimicrobiana são conhecidas, porém quando se trata de resistência a beta-lactâmicos, três mecanismos principais são descritos: ação enzimática, destruindo total ou parcialmente o anel beta-lactâmico; modificação do alvo antimicrobiano, causando diminuição, ou perda total da afinidade entre o antimicrobiano e o seu sítio de ligação; e atuação de bombas de efluxo, expulsando os fármacos antimicrobianos do citoplasma, ou periplasmas bacterianos (MAJIDUDDIN et al., 2002).

Betalactamases são enzimas que têm a capacidade de hidrolisar os betalactâmicos, tornando-os ineficazes (MAJIDUDDIN et al., 2002). Estas enzimas são produzidas por bactérias Gram positivas, anaeróbicas e Gram negativas, apresentando grande importância neste último grupo, onde a produção dessa enzima é o principal mecanismo

de resistência aos betalactâmicos (SHAIKH et al., 2015). Essa produção enzimática pode ser mediada por genes plasmidiais ou cromossômicos, e nesse caso são facilmente induzíveis (OLSEN et al., 2006). Por outro lado, quando estão relacionadas à presença de plasmídeos são transferidas com facilidade, como ocorre nas betalactamases produzidas por *Moraxella catarrhalis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (SUAREZ; GUDIOL, 2009). O gene responsável pela indução da síntese dessa enzima é o blaZ. Esta síntese pode ocorrer de forma constitutiva ou regulada pela presença de antimicrobiano no meio, através do gene antirrepressor blaRI e do gene repressor blaI (LI et al., 2007). Já tendo sido relatada a transferência desse gene entre cepas de SCN e *S. aureus*, o que sugeriu que SCN sejam reservatórios desses genes para outras espécies de bactérias (OLSEN et al., 2006). A presença do gene blaZ vem sendo relatada em bactérias isoladas tanto em humanos (SCHMIDT et al., 2015) como em cães (KANG et al., 2014), gatos (BIEROWIEC et al., 2016), bovinos (KLIMIENE et al., 2016), bubalinos (MEDEIROS et al., 2011), caprinos e ovinos (MERZ et al., 2016) e diversas outras espécies animais (BAGCIGIL et al., 2012). No Brasil, o gene blaZ foi observado em diversos estudos que caracterizaram *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite, principalmente na espécie bovina, demonstrando que este gene está amplamente distribuído entre cepas de todo o país. Na região Nordeste, por exemplo, Krewer et al. (2015) detectaram a presença desse gene em 93,1% (203/218) das cepas isoladas de rebanhos bovinos. Outro mecanismo de resistência bacteriana frente aos beta-lactâmicos é a modificação do sítio de ligação dessa droga na bactéria. A ineficácia do antimicrobiano fica evidente, neste caso, a partir do entendimento de que, para exercerem sua atividade, os beta-lactâmicos precisam se ligar às proteínas ligadoras de penicilina, do termo em inglês penicilin-binding-protein (PBP), existentes nas camadas mais externas da membrana citoplasmática bacteriana, às quais os beta-lactâmicos se ligam para penetrar no citoplasma da célula (LESKI; TOMASZ, 2005). PBPs são proteínas com atividade enzimática de grande importância na síntese da parede celular bacteriana, sendo encontrada naturalmente em quatro formas ativas denominadas de 1, 2, 3 e 4 (LESKI; TOMASZ, 2005). Entretanto, bactérias resistentes têm a capacidade de modificar essas proteínas, mais precisamente pela produção de uma PBP diferente das endógenas, chamadas de PBP2a ou PBP2', como ocorre com os MRSA, mantendo sua atividade enzimática ativa, mas diminuindo a afinidade com os beta-lactâmicos e, conseqüentemente, a efetividade do antimicrobiano. Assim, na presença de beta-lactâmicos, as PBPs endógenas são desativadas, enquanto a

PBP2a consegue manter a síntese de paredecelular (SUAREZ; GUDIOL, 2009). O determinante genético para a modificação dessas proteínas é o gene *mecA*. Este gene está localizado numa ilha genética móvel denominada Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*), facilitando sua transferência horizontal entre 43 diferentes cepas bacterianas (KONDO et al., 2007). Atualmente, estão caracterizados doze tipos diferentes do SCC*mec* (SCC*mec*I a XII), de acordo com as sequências de nucleotídeos observadas (SHORE; COLEMAN, 2013; WU et al., 2015). Além disso, em 2011, um gene homólogo ao gene *mecA*, chamado de *mecC* foi detectado em amostras de leite de vacas na Inglaterra (SHORE et al., 2011) e em amostras clínicas humanas no Reino Unido e Dinamarca (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011), passando, posteriormente, a ser detectado em vários outros países a partir de amostras clínicas humanas (BECKER et al., 2016; LINDGREN et al., 2016) e de leite de vacas (UNNERSTAD et al., 2013; GINDONIS et al., 2013). A utilização de métodos diagnósticos fenotípicos e genotípicos para a avaliação do perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. tem sido realizada por diversos pesquisadores, principalmente quando considerados a possibilidade de transferência de patógenos multirresistentes aos humanos e outros animais, bem como a importância dos prejuízos econômicos associados a este fenômeno (UM et al., 2014;). Fenotipicamente a resistência a meticilina pode ser identificada por meio dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e concentração inibitória mínima (CIM), em ambos, as drogas de eleição são a cefoxitina e/ou oxacilina (CLSI, 2008). A nível molecular é possível identificar MRS utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) por meio da amplificação dos genes *mecA* e *mecC*. A PCR atualmente é a técnica de maior utilização para detecção de MRS, pois como baseia-se na amplificação de DNA gerando resultados confiáveis e diminuindo o risco da identificação de falsos negativos (PATERSON et al., 2012; CHANDRASEKARAN et al., 2014).

A ação de bombas de efluxo compõem um outro mecanismo de resistência antimicrobiana. Bombas de efluxo são proteínas de transporte envolvidas na extrusão de substâncias tóxicas à célula, incluindo todas as classes de antimicrobianos clinicamente relevantes, do meio intracelular para o ambiente externo. Estas proteínas são encontradas tanto em bactérias Gram negativas como Gram positivas, bem como em organismos eucariotos. O sistema de efluxo pode ser específico, transportando apenas uma classe de antibióticos, ou transportando diferentes classes de antibióticos, sendo designadas bombas de efluxo associadas à multirresistência antimicrobiana (KUMAR; SCHWEISER, 2005). Cinco famílias de bombas de efluxo são conhecidas, são elas:

SMR (Small Multidrug Resistance), RDN (Resistance- Nodulation-Division), ABC (Adenosine Triphosphate (ATP)-Binding Cassette), MFS (Major Facilitator Superfamily) e MATE (Multidrug And Toxic Compound Extrusion), formadas por diferentes proteínas que são agrupadas de acordo com a sequência de aminoácidos que as compõem. Nos microrganismos Gram positivos, a família MFS é a de maior relevância, com destaque para a proteína NorA em *Staphylococcus aureus* (BLANCO et al., 2016). A expressão dessas proteínas é determinada por genes presentes no cromossomo ou em elementos genéticos móveis. Nesse contexto, as bombas de efluxo codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano podem explicar a resistência inerente de algumas espécies bacterianas a grupos específicos de antimicrobianos (SINGH et al., 2002), com ênfase para tetraciclina, macrolídeos e fluoroquinolonas. No entanto, é nas fluoroquinolonas que muita atenção tem sido dada, uma vez que esta classe de antibióticos inclui vários sistemas de efluxo identificados em *S. aureus*, incluindo NorA, NorB, NorC, MepA e MdeA (COSTA et al., 2013). Estudos realizados para verificar a contribuição deste sistema para a resistência às fluoroquinolonas associaram sua atividade a uma suscetibilidade reduzida a essa classe de antibióticos (DEMARCO et al., 2007; COSTA et al., 2011). Além disso, esta mesma atividade de efluxo pode estar associada à diminuição da suscetibilidade a antimicrobianos adicionais, como biocidas e corantes (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2013), destacando o potencial dessas bombas de efluxo para transmitir um fenótipo de multirresistência para cepas de *S. aureus*. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e CIM utilizando norfloxacin são utilizados para detecção fenotípica desse sistema em cepas de *S. aureus*, sendo a presença de resistência a esta droga considerada indicativa de efluxo (DEMARCO et al., 2007).

Desta forma, o monitoramento da resistência em *Staphylococcus* spp. é de extrema importância, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência. Tal conduta minimiza falhas terapêuticas e potencializam os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, problemas bastante atuais nos campos da saúde humana e animal (COSTA et al., 2013).

3.2. REFERÊNCIAS

ASLAM, N.; IZHAR, M.; MEHDI, N. Frequency of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nasal colonization among patients suffering from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 29, n. 6, p. 1430– 1432, 2013.

AZEVEDO, S. M. M. Farmacologia dos Antibióticos Beta-lactâmicos. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, 57p. 2014.

BAGCIGIL, A. F. et al. Genetic basis of penicillin resistance of *S. aureus* isolated in 49 bovinemastitis. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54, n. 1, p. 69, 2012.

BARKEMA, H.W. et al. Invited review: the role contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v.92, p 4717-4729, 2009.

BECKER, K. et al. *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates by the New Xpert MRSA Gen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 180–184, 2016.

BIEROWIEC, K.; PŁONECZKA-JANECZKO, K.; RYPUŁA, K. Is the colonisation of *Staphylococcus aureus* in pets associated with their close contact with owners? **PLoS ONE**, v.11, n. 5, p. 1–14, 2016.

BLANCO, P. et al. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic ResistanceDeterminants. **Microorganisms**, v. 4, n. 1, p. 14, 2016.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32 n.1 p-79-82, 2002.

BRITO, M.A.V.P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para

amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p.531-537, 2001.

CAPURRO, A. et al. Identification of potential sources of *Staphylococcus aureus* in herds with mastitis problems. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 1, p. 180-191, 2010.

CHANDRASEKARAN, D. et al. A study on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* mastitis in dairy cattle. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 356-361, 2014.

CHO, O.H. et al. Prevalence and Microbiological Characteristics of qacA/B- Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates in a Surgical Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, 2017.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3rd ed. M31-A3. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.

COSTA S. S. et al. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an update. **Open Microbiology Journal**, v. 7, p. 59–71, 2013.

COSTA, M. G. et al. Resistencia a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico.**, São Paulo, v.80, n.3, p. 297-302, 2013.

COSTA, S. S. et al. Exploring the contribution of efflux on the resistance to fluoroquinolones in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **BMC Microbiology**, v. 11, p. 241, 2011.

DEMARCO, C.E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3235-9, 2007.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo:

LemosEditorial & Graficos Ltda. 175 p., 2001.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L. et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. **TheLancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 595–603, 2011.

GIEDRAITIENĖ, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria.

Med. (Kaunas, Lithuania), v. 47, n. 3, p. 137–46, 2011.

GINDONIS, V. et al. Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 61, p.2-8, 2013.

GREMA, H. A. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A Review. **Adv. Anim.Vet. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 79–98, 2015.

HIRAMATSU, K. et al. . Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.40, p.135-136, 2001.

ITO, T. et al. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.45 p.1323-1336, 2001.

KANG, M. H. et al. Antibiotic resistance and molecular characterization of ophthalmic *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **Journal of Dairy Science**, v. 15, n. 3, p.409– 415, 2014.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **The Veterinary clinics of North America. Food animal practice**, v. 28, n. 2, p. 203–16, 2012.

KLIMIENE, I. et al. Phenotypical and Genotypical Antimicrobial Resistance of Coagulase- negative *staphylococci* Isolated from Cow Mastitis. **Pol. J. Vet. Sci.**, v. 19, n.

3, p. 639–646, 2016.

KONDO, Y. et al. Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 264-74, 2007.

KREWER, C. C. et al. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Trop. Anim. Health Prod.**, v. 47, n. 3, p. 511–518, 2015.

KULKARNI A.G; KALIWAL B. Bovine mastitis: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 4, p. 543-548, 2013.

KUMAR A, SCHWEIZER HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 57, n. 1, p. 486- 513, 2005.

LESKI, T. A; TOMASZ, A. Role of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) in the Antibiotic Susceptibility and Cell Wall Cross-Linking of *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 2, n. 5, p. 1815–1824, 2005.

LI, X. et al. β -Lactam resistance and β lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v.121, n.197, p.214, 2007.

LINDGREN, A. K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with *mecC*: a description of 45 human cases in southern Sweden. Eur. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 35, n. 6, p. 971–975, 2016.

MAJIDUDDIN, F. K.; MATERON, I. C.; PALZKILL, T. G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 2, p. 127-137, 2002.

MEDEIROS, E. S. et al. Antimicrobial resistance of staphylococcus spp. isolates from cases of mastitis in buffalo in Brazil. **J. Vet. Diag. Inv.**, v. 23, n. 4, p. 793–796, 2011.

MERZ, A.; STEPHAN, R.; JOHLER, S. *Staphylococcus aureus* isolates from goat and sheep milk seem to be closely related and differ from isolates detected from bovine milk. **Front. Microbiol.**, v. 7, n. MAR, p. 1–7, 2016.

MU, Q. et al. Occurrence of sulfonamide, tetracycline, plasmid mediated quinolone and macrolide resistance genes in livestock feedlots in Northern china. **Environmental science and pollution research**, p. 9, 2014.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol. Spect.**, v. 4,n. 2, p. 1–37, 2016.

MURRAY, R. et al. **Microbiologia medica.** 5 edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2006.

NEVES M.C. et al. 2007. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos eplasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arqs Inst. Biológico**, v. 74, n. 3, p. 2007-2013, 2007.

OLIVER, S. P. et al. Efficacy of extended ceftiofur intramammary therapy for treatment of subclinical mastitis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2393–400,2004.

OLSEN, J. E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M. Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *staphylococci*. **J. Antimicrob. Chemot.**, v. 57,n. 3, p. 450–460, 2006.

PATERSON G.K. et al. The newly described mecA homologue, mecALGA251, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 67, n. 12, p. 2809-2813, 2012.

RABELLO, R. F. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de mastite subclínica no estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 100 p. : il. 2003.

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**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, R. P. Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de fossa nasal e glândula mamaria de vacas leiteiras por diferentes métodos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 75 p. : il. 2017.

SCHMIDT, T.; KOCK, M. M.; EHLERS, M. M. Diversity and antimicrobial susceptibility profiling of *staphylococci* isolated from bovine mastitis cases and close human contacts. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 9, p. 6256–6269, 2015.

SHAIKH, S. et al. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Sau. J. Biol. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 90–101, 2015.

SHORE, A. C. et al. Detection of staphylococcal cassette chromosome mec type XI carrying highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* genes in human clinical isolates of clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 8, p. 3765–3773, 2011.

SHORE, A. C.; COLEMAN, D. C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 303, n. 6–7, p. 350–359, 2013.

SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 32p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 32 p : il. 2008.

SINGH, R. et al. Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p. 1680-1685, 2012.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v. 27, p.116-129, 2009.

THORBERG, B.M. Coagulase-negative staphylococci in bovine sub-clinical mastitis. Licentiate thesis - Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences, p. 1653-8315 , 2008.

TOZZETI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. Prevenção , controle e tratamento das mastites bovinas – revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 10, n. 7, 2008.

UNNERSTAD, H. E. et al.. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* containing mecC in Swedish dairy cows. **Acta Vet. Scan.**, v. 55, n.6, p. 46, 2013.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **P & T : A Peer- Reviewed Journal for Formulary Management**, v. 40, n. 4, p. 277–83, 2015.

WU, Z. et al. Novel type XII staphylococcal cassette chromosome mec harboring a new cassette chromosome recombinase, CcrC2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** ,v. 59, n. 12, p.7597–7601, 2015.

4. CAPÍTULO 2 - Artigo submetido à revista *Acta Veterinária Basílica*.

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Staphylococcus* spp ISOLADOS DE MASTITE EM BOVINOS LEITEIROS NO AGRESTE PARAIBANO.

Camila Pereira da Silva¹; Ewerton de Souza Lima¹; Raphael Ferreira Ordonho¹;
Clebson Santos de Sales¹; Artur Cesar de Carvalho Fernandes¹

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Da Paraíba, Centro de Ciências
Agrárias.

RESUMO

O presente estudo objetivou determinar o perfil de resistência de *Staphylococcus* spp a diferentes classes de antimicrobianos e avaliar fenotipicamente a ocorrência de resistência à meticilina e resistência causada por bomba de efluxo em isolados de vacas com mastite clínica e subclínica na região Agreste da Paraíba, Brasil. Para o estudo da sensibilidade e resistência dos *Staphylococcus* spp foi empregada a técnica de difusão em discos frente aos principais antibióticos utilizados para tratamento desta enfermidade na região. Discos de cefoxitina (30 mcg) e oxacilina (1 mcg) foram utilizados para avaliar resistência à meticilina, e discos de norfloxacin (10 mcg) foram utilizados para detecção fenotípica de sistema de efluxo. Das 326 amostras de leite analisadas, foram isoladas cepas de *Staphylococcus* spp. em 60, sendo 83,3% *S. aureus*, 8,33% *S. chromogenes*, 5% *S. epidermidis* e 3,33% *S. sciuri*. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos apontaram pouca variação nos perfis de resistência dos isolados. Isolados resistentes a penicilina sensíveis às demais drogas testadas constituíram o padrão de resistência predominante. Todos os isolados estudados foram sensíveis a oxacilina e cefoxitina, exceto em 5 cepas de *S. aureus*, 1 cepa de *S. chromogenes* e 1 cepa de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a oxacilina e 2 cepas de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a cefoxitina, sendo consideradas fenotipicamente resistentes a meticilina. A detecção fenotípica de sistema de efluxo não foi observada neste estudo, uma vez que todas as amostras de *Staphylococcus* sp. avaliadas foram sensíveis a norfloxacin.

Palavras-chave: antimicrobianos; resistência; *Staphylococcus* sp; mastite bovina; meticilina.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the resistance profile of *Staphylococcus* spp to different classes of antimicrobials and to phenotypically evaluate the occurrence of resistance to methicillin and resistance caused by efflux pump in isolates from cows with clinical and subclinical mastitis in the state of Paraíba, Brazil. To study the sensitivity and resistance of *Staphylococcus* spp, the disk diffusion technique was used against the main antibiotics used to treat this disease in the region. Cefoxitin (30 mcg) and oxacillin (1 mcg) discs were used to assess methicillin resistance, and norfloxacin (10 mcg) discs were used for phenotypic detection of an efflux system. Of the 326 milk samples analyzed, 60 strains of *Staphylococcus* spp. were isolated, being 83.3% *S. aureus*, 8.33% *S. chromogenes*, 5% *S. epidermidis* and 3.33% *S. sciuri*. Antimicrobial susceptibility tests showed little variation in the isolates' resistance profiles. Isolates resistant to penicillin and sensitive to the other drugs tested constituted the predominant resistance pattern. All isolates studied were sensitive to oxacillin and cefoxitin, except for 5 strains of *S. aureus*, 1 strain of *S. chromogenes* and 1 strain of *S. epidermidis*, which showed resistance to oxacillin and 2 strains of *S. epidermidis*, which showed resistance cefoxitin, being considered phenotypically resistant to methicillin. The phenotypic detection of an efflux system was not observed in this study, since all *Staphylococcus* sp. evaluated were sensitive to norfloxacin.

Keywords: antimicrobials; resistance; *Staphylococcus* sp; bovine mastitis; methicillin.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças infecciosas mais comuns e dispendiosas na bovinocultura leiteira em todo o mundo (BARKEMA et al., 2009). Não apenas pela redução expressiva da produção, mas também pelo descarte e perda de qualidade do leite e dos derivados lácteos, e sobretudo, pela dificuldade de controle nos rebanhos, associados principalmente a tratamentos inadequados, como o uso indiscriminado de antimicrobianos (SANTOS, 2017).

Um grupo diversificado de microrganismos tem sido reportado à mastite bovina, sendo os *Staphylococcus* spp. os agentes etiológicos mais isolados em casos de mastite contagiosa, associadas as formas clínicas e/ou subclínicas da afecção (RABELLO, 2003;

SANTOS et al., 2003; SILVA, 2008) e neste gênero, a espécie *S. aureus* é prevalente em infecções de vacas leiteiras (BRITO et al., 2001).

Além de sua potencial virulência, *S. aureus* também apresenta uma notável diversidade de mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos (CHAMBERS; DE LEO, 2009). Uma grande preocupação são as cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, que por muitos anos causaram grandes surtos em ambientes nosocomiais e que agora estão cada vez mais isolados da comunidade, onde também podem causar infecções graves, muitas vezes fatais (DAVID; DAUM, 2010). Estas bactérias podem usar diferentes mecanismos de resistência aos antibióticos, que incluem degradação ou modificação do antibiótico; alteração do alvo bacteriano do antibiótico; alveja a proteção e a redução da concentração intracelular do antibiótico, seja por uma permeabilidade diminuída da parede celular ou pelo efluxo do antibiótico da célula. A resistência mediada pelo efluxo foi ofuscada em contraste com os outros mecanismos conhecidos. No entanto, tem recebido mais interesse, pois reconhecemos que muitas bombas de efluxo bacteriano são capazes de expulsar várias classes não relacionadas de compostos antimicrobianos da célula, promovendo o aparecimento de fenótipos de resistência a múltiplas drogas (PIDDOCK, 2006; ALEKSHUN, 2007).

A utilização de métodos diagnóstico fenotípicos e genotípicos para identificação mecanismos de resistência de *Staphylococcus* spp. tem sido realizada por diversos pesquisadores, principalmente quando considerados a possibilidade de transferência de patógenos multirresistentes aos humanos e outros animais, bem como a importância dos prejuízos econômicos associados a este fenômeno (DURAN et al., 2012; FRANCA et al., 2012; MU et al., 2014). Desta forma, o presente estudo teve como objetivo determinar o perfil de resistência de *Staphylococcus* spp a diferentes classes de antimicrobianos e avaliar fenotipicamente a ocorrência de *Staphylococcus* spp. resistente à meticilina e resistência causada por bomba de efluxo em isolados de infecções mamárias de bovinos leiteiros na região Agreste da Paraíba, Brasil.

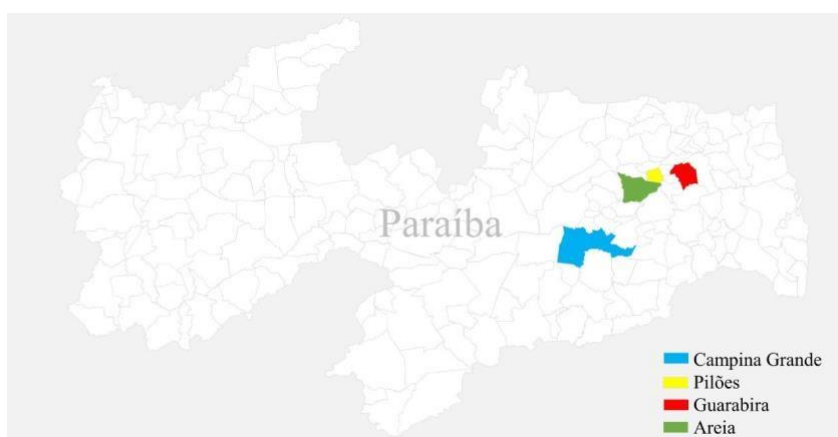
MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram selecionados animais procedentes de propriedades de exploração leiteira

de municípios localizados no Agreste do Estado de Paraíba (Figura 1). As amostras de leite foram colhidas, em tubos falcon estéreis, dos quartos mamários que apresentarem mastite clínica, positivos ao teste da caneca telada, e daqueles com mastite subclínica, positivos ao California Mastitis Test (CMT), após prévia lavagem do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e antissepsia do óstio do teto com álcool a 70%. Após a colheita, as amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva do Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (CCA/UFPB).

Figura 1. Mapa dos municípios incluídos no estudo para avaliação do perfil de resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus* spp. isolados de casos de mastite bovina no Estado da Paraíba.



Isolamento e identificação de *Staphylococcus* spp.

Para isolamento e identificação dos *Staphylococcus* spp, 326 amostras de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar sangue base, suplementado com sangue de carneiro desfibrinado (5%), sendo posteriormente incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas. Foram observadas as características de crescimento das colônias em placa e características morfo- tintoriais utilizando o método de coloração pela técnica de Gram. Foram considerados como *Staphylococcus* sp. os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos, agrupados em cachos e que produziram a enzima catalase. Após identificação os isolados de *Staphylococcus* spp. foram estocados em caldo BHI com 20% de glicerol e encaminhadas para identificação da espécie.

A Identificação das espécies de *Staphylococcus* sp. utilizando Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF)[A técnica de MALDI-TOF foi utilizada como padrão ouro para identificação das espécies de *Staphylococcus* sp. Os isolados foram analisados utilizando o equipamento Vitek MS (BioMérieux, France) no Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Universidade de São Paulo (USP).

Testes de Susceptibilidade aos antimicrobianos **Teste de difusão em discos**

Todas as amostras de *Staphylococcus* spp. foram submetidas a avaliação frente a antimicrobianos comumente utilizados no controle da mastite bovina, utilizando protocolo recomendado pelo CLSI (2018). Colônias puras recentes (18 a 24 horas) dos espécimes previamente isolados e identificados foram semeadas em caldo BHI até atingir turvação correspondente a 0,5 da escala de MacFarland, sendo posteriormente semeados com auxílio de suabes na superfície de Agar Mueller-Hinton (MH) e, após absorção, os seguintes discos de antimicrobianos foram adicionados: Sulfazotrim (30 mcg), enrofloxacin (5 mcg), gentamicina (30 mcg), penicilina (10 mcg), tetraciclina (30 mcg), cefepime (30 mcg), florfenicol (30 mcg) e eritromicina (15 mcg).

Teste fenotípico de triagem para resistência à meticilina e bomba de efluxo

Os espécimes de *Staphylococcus* spp. previamente isolados e identificados foram submetidos ao teste de triagem para detecção de amostras resistentes à meticilina utilizando o teste de disco difusão em ágar MH com discos de cefoxitina (30 mcg) e oxacilina (1 mcg), como descrito pelo CLSI (2018). As amostras que apresentaram diâmetro de zona de crescimento ≥ 21 mm foram consideradas como resistentes à meticilina. Para detecção fenotípica de sistema de efluxo foi utilizado teste de disco difusão em ágar MH com discos de norfloxacin (10 mcg), sendo a presença de resistência a esta droga, determinada por diâmetro de zona de crescimento ≥ 17 mm, considerada indicativa de efluxo (DEMARCO et al., 2007).

Análise dos dados

A análise estatística foi realizada com auxílio do software R 4.0.0 (CORE TEAM, 2018). Os dados foram analisados por meio de modelo linear generalizado (GLM), tal como recomendado em UNESP (2011). O modelo para avaliar os diferentes

isolados em condições de clínica e subclínica considerou a distribuição multinomial e link da função “logit e acumulativo”. O modelo para avaliar a sensibilidade aos diferentes antibióticos considerou a distribuição binomial com link da função “logit”. Diferenças entre as classes de mastite foram consideradas significativas de acordo com o teste Qui-quadrado ($P \leq 0,05$). Diferenças entre isolados ou entre antibióticos foram comparadas pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de rebanhos leiteiros na região do Agreste Paraibano foi de 18,4%, ou seja, das 326 amostras de leite analisadas, foram isoladas cepas de *Staphylococcus* spp. em 60 amostras (Tabela 1). O restante das amostras analisadas (81,6%) apresentaram, em grande maioria, crescimento bacteriano negativo e isolamento de outros agentes, sendo o *Streptococcus* spp. o mais frequente. Resultados semelhantes foram encontrados por Fagundes et al. (2010), que ainda descreveram o gênero *Staphylococcus* com um dos principais patógenos isolados de mastite bovina.

Tabela 1. Prevalência de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite de rebanhos leiteiros na região do Agreste Paraibano.

Amostras/Isolados	Total	(%)
Amostras analisadas	326	100
Amostras negativas para <i>Staphylococcus</i> spp.	266	81,60
Amostras positivas para <i>Staphylococcus</i> spp.	60	18,40
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	83,33
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	5	8,33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	5,00
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2	3,33

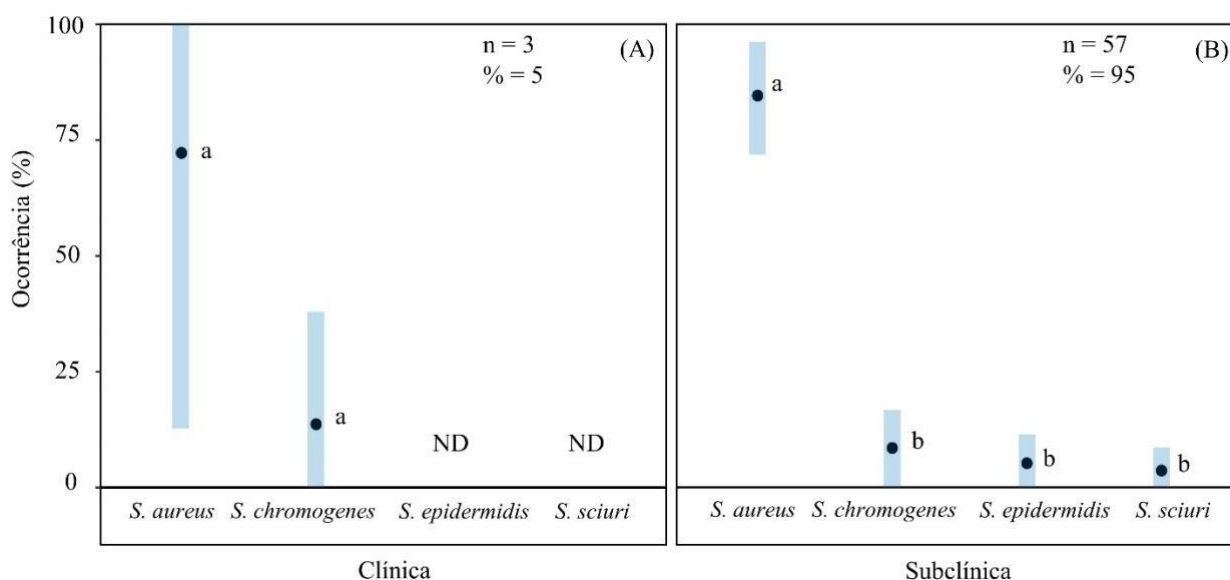
Dentre os isolados de *Staphylococcus* spp., 83,3% (50/60) foram identificados como *Staphylococcus aureus*, 8,33% (5/60) como *Staphylococcus chromogenes*, 5% (3/60) como *Staphylococcus epidermidis* e 3,33% (2/60) como *Staphylococcus sciuri*. A maior prevalência de *S. aureus* ratifica sua ação como principal agente etiológico da mastite bovina (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A condição de mastite subclínica predominou entre os animais avaliados (95%), e apenas 5% dos diagnósticos compreenderam a condição de mastite clínica (Figura 2 A e B). A predominância da mastite subclínica em bovinos, em relação a forma clínica, é

bastante difundida na literatura. No Brasil, a mastite subclínica apresenta prevalência muito superior a clínica, ocorrendo na maioria dos casos em bovinos leiteiros (SANTOS et al., 2003; FREITAS et al., 2005). Barbalho e Mota (2001) encontraram 104 amostras positivas para a mastite subclínica, perfazendo 60,5% do total de 172 amostras de leite analisadas procedentes da região Metropolitana do Recife e Agreste do estado de Pernambuco. Santos et al. (2003) demonstrou que o índice de mastite subclínica em rebanhos leiteiros pode chegar até 80% dos quartos mamários, dependendo do tipo de exploração leiteira. A ausência de sintomas da mastite subclínica relaciona-se diretamente com a alta prevalência dessa doença nos rebanhos leiteiros (WHELEHAN et al., 2011; SILVA, 2016), sendo considerada a forma de apresentação de mastite de maior importância epidemiológica por alastrar-se silenciosamente pelo rebanho sem que sejam percebidas alterações macroscópicas à inspeção do úbere ou de sua secreção (BARBALHO; MOTA, 2001).

Portanto, apenas 5% dos isolados foram provenientes de animais que apresentaram mastite clínica, sendo 67% (2/3) de *S. aureus* e 33% (1/2) de *S. chromogenes* (Figura 2A). Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as proporções de *S. aureus* e *S. chromogenes* para os casos de mastite clínica, e não foram identificadas cepas de *S. epidermidis* e *S. sciuri* nessas amostras. As prevalências de *S. aureus* e *S. chromogenes* não devem ser consideradas como representativas para animais com mastite clínica, pois o tamanho da amostra (apenas 3 indivíduos) para a condição de clínica impossibilita uma discussão.

Figura 2. Probabilidade da presença de isolados no leite de vacas com mastite, em condições de clínica (A) e subclínica (B), no Agreste Paraibano.



Área sombreada representa o erro padrão. Colunas com letras diferentes são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). ND = Não determinado.

O *S. aureus* se destacou como o principal patógeno envolvido nos casos de mastite subclínica, com prevalência de 84,2% (48/57), significativamente ($P < 0,05$) superior a prevalência dos demais patógenos (Figura 2B). Embora *S. aureus* apareça como principal agente causal da mastite bovina em vários estudos (BRITO et al., 2002; RABELLO, 2003; SANTOS et al., 2003; SILVA, 2008.) assim como nesta pesquisa, a ocorrência de *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. sciuri* nos casos de mastite subclínica foram de 7% (4/57), 5,3% (3/57) e 3,5% (2/57), respectivamente. Os resultados indicam considerável participação destes agentes na etiologia infecciosa de mastite bovina no Agreste Paraibano. Estas espécies de *Staphylococcus* fazem parte do grupo dos *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), sendo comumente encontrados no ambiente dos estabelecimentos de ordenha, em equipamento de ordenha e na pele dos tetos dos animais (COSTA et al., 2005). O aumento da prevalência das mastites bovinas por SCN é assinalado por diversos autores, principalmente em rebanhos que adotaram programas efetivos de controle das infecções intramamárias causadas por agentes contagiosos como *Staphylococcus aureus* (LAFFRANCHI et al., 2001). Levantamentos realizados em diversas regiões do Brasil apontaram prevalências de SCN variáveis entre 12,3% e 46,3% (BARBALHO; MOTA, 2001; DONATELE et al., 2002), corroborando com os resultados encontrados neste estudo, cuja prevalência de isolamento de SCN foi de 15,8%. Apesar de serem considerados agentes secundários por provocarem poucas alterações no úbere e no leite ordenhado de animais infectados (THORBERG, 2008), alguns estudos apontam que as infecções ocasionadas por este grupo de agentes podem se tornar persistentes, com repercussões negativas na qualidade do leite (ZADOKS et al., 2001)

A sensibilidade dos patógenos a diferentes antibióticos foi significativamente ($P < 0,01$) diferente entre os “Isolados” e entre os “Antibióticos” (Tabela 2). Também foi observada interação significativa ($P < 0,05$) entre os fatores “Isolados” e “Antibióticos”, indicando que a inibição do crescimento dos patógenos pode diferir entre as classes de antibióticos.

Tabela 2. Qui-Quadrado da razão de verossimilhanças para testar a sensibilidade dos diferentes isolados a diferentes antibióticos com base na razão das frequências observadas para as esperadas.

Fonte de variação	Qui-Quadrado	Grau de Liberdade	Valor-p
Isolados	11,957**	3	0,008
Antibióticos	274,622**	10	<2,2e-16
Isolados vs antibióticos	45,026*	30	0,038

** e *Significativo ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente) de acordo com o teste Qui-Quadrado da razão de verossimilhanças.

A susceptibilidade de *S. aureus* foi de 100% para sulfazotrim e gentamicina, 96% para tetraciclina, 94% para eritromicina e apenas 6% para penicilina (Tabela 3). Este resultado indica que o principal patógeno envolvido nos casos de mastite subclínica no Agreste Paraibano é resistente ao antibiótico penicilina. Contudo, destaca-se a elevada eficiência dos demais antibióticos no controle de *S. aureus*, sobretudo de sulfazotrim e gentamicina.

Grandes diferenças quanto aos índices de resistência à penicilina têm sido observadas entre países. Vintov et al. (2003) verificaram altas frequências de resistência à penicilina na Irlanda (71,4%), Inglaterra (67,3%) e nos Estados Unidos (50%), enquanto frequências menores foram observadas nos países escandinavos, incluindo a Dinamarca (18,7%), Noruega (2 %) e Suécia (28,5%). Pitkala et al. (2004) verificaram que mais da metade das amostras de *S. aureus* isoladas de casos de mastite em rebanhos bovinos da Finlândia foram resistentes à penicilina (52,1%), índice significativamente maior que o registrado em outros países nórdicos. Segundo esses autores, o índice elevado de resistência à penicilina e derivados na Finlândia está associado ao uso rotineiro de formulações intramamárias para o tratamento da mastite naquele país, em contraste com as políticas rígidas de controle do uso de antimicrobianos em países nórdicos. Tal argumento também pode ser utilizado para justificar o elevado índice de resistência para penicilina observado em nosso estudo, tendo em vista o uso intensivo de preparações contendo esse princípio ativo na rotina veterinária para o tratamento de infecções intramamárias em vacas secas ou lactantes, ou mesmo de outras patologias de origem infecciosas em rebanhos brasileiros.

No que se refere à resistência aos demais antimicrobianos analisados, os resultados obtidos no presente estudo foram discrepantes daqueles obtidos por Lange et

al. (1999), que embora também tenham demonstrado altos índices de resistência à penicilina para isolados de

S. aureus provenientes de rebanhos leiteiros do sul do Brasil, diferentemente de nossos resultados, constataram que 48% foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Também foram diferentes daqueles relatados por Silveira-Filho et al. (2005), que verificaram índices de resistência superiores a 50% para gentamicina e tetraciclina em rebanhos leiteiros do estado de Pernambuco. Resistência à gentamicina em *S. aureus* associada à mastite bovina foi incomum entre isolados testados no presente estudo e em relação a estudos prévios realizados em outras bacias leiteiras do Brasil (CARDOSO et al., 2000; DONATELE et al., 2002; RABELLO et al., 2005).

Tabela 3. Sensibilidade (probabilidade) dos isolados do leite de vacas com mastite aos diferentes antibióticos.

Antibiótico	Isolados			
	<i>S. aureus</i>	<i>S. chromogenes</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. sciuri</i>
Cefepime	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	1,00±7e-06 a	1,00±9e-06 a
Cefoxitina	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	0,33±0,272 a	1,00±9e-06 a
Enrofloxacin	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	1,00±7e-06 a	1,00±9e-06 a
Eritromicina	0,94±0,034 a	1,00±6e-06 a	0,67±0,272 a	1,00±9e-06 a
Florfenicol	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	1,00±7e-06 a	1,00±9e-06 a
Gentamicina	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	0,67±0,272 a	1,00±9e-06 a
Norfloxacin	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	1,00±7e-06 a	1,00±9e-06 a
Oxacilina	0,91±0,042 a	0,60±0,219 a	0,67±0,272 a	1,00±9e-06 a
Penicilina	0,06±0,034 b	0,40±0,219 a	0,67±0,272 a	0,00±9e-06 a
Sulfazotrim	1,00±2e-06 a	1,00±6e-06 a	0,33±0,272 a	1,00±9e-06 a
Tetraciclina	0,96±0,028 a	0,60±0,219 a	1,00±7e-06 a	1,00±9e-06 a

Valores de probabilidade com letras diferentes, na coluna, são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A susceptibilidade de *S. chromogenes* foi de 100% para sulfazotrim, eritromicina e gentamicina, 60% para tetraciclina e 40% para penicilina. Por sua vez, a susceptibilidade *S. epidermidis* foi de 100% para tetraciclina, 66,6% para gentamicina, penicilina e eritromicina, e 33,3% para sulfazotrim. Por fim, *S. sciuri* apresentou susceptibilidade de 100% para todos os antimicrobianos testados, com exceção de penicilina, como 100% de resistência. A baixa frequência de isolamentos de SCN e a susceptibilidade dos mesmos para a maioria dos antimicrobianos testados podem sugerir que estes tenham importância secundária na etiologia da mastite na região estudada. No

entanto, estudos demonstraram que as infecções por esses agentes são de extrema relevância para vacas primíparas (SEARS; MACCARTHY, 2003), adquirindo maior expressão em rebanhos nos quais as infecções por patógenos maiores foram controladas (SCHUKKEN et al., 2009).

A avaliação fenotípica de resistência a meticilina foi realizada neste estudo através do teste de difusão em disco com oxacilina e cefoxitina, como preconizado pelo CLSI (2018). É importante destacar que a sensibilidade a oxacilina de *S. aureus*, *S. chromogenes*, *S. epidermidis* e *S. sciuri* foi de 91, 60, 67 e 100%, respectivamente, e a sensibilidade a cefoxitina de *S. epidermidis* foi de 66%, indicando resistência de baixo nível a estes antibióticos. Todos os isolados estudados foram sensíveis a estes antibióticos, exceto em 5 cepas de *S. aureus*, 1 cepa de *S. chromogenes* e 1 cepa de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a oxacilina e 2 cepas de *S. epidermidis*, que apresentaram resistência a cefoxitina, sendo consideradas fenotipicamente resistentes a meticilina. A diferença entre os perfis de resistência fenotípica a estes antibióticos pode estar ligada à variabilidade genética dos isolados de estafilococos e estudos moleculares para detecção de genes de resistência devem ser realizados para a confirmação do diagnóstico em todas as amostras estudadas, uma vez que a presença do gene *mecA* já foi observada na ausência de resistência fenotípica a meticilina (MELO et al., 2014).

O uso generalizado de agentes beta-lactâmicos em laticínios para fins terapêuticos e profiláticos pode ser considerado a força motriz para a ocorrência comum de resistência a agentes beta-lactâmicos, como penicilina e oxacilina. Um estudo no estado da Paraíba, nordeste do Brasil, relataram que 33% dos isolados de *S. aureus* identificados a partir de casos de mastite em rebanhos leiteiros mostraram ser resistentes à meticilina, confirmado pela presença do gene *mecA* (OLIVEIRA et al. 2016). Essa evolução decorre, em parte, da aquisição de elementos cromossômicos (SCCmec) que carregam o gene *mecA*, e pode ser transferido a seres humanos (MELO et al., 2014), assumindo grande relevância para saúde pública, especialmente na região estudada, considerando marcante cultura do consumo de leite cru.

A detecção fenotípica de sistema de efluxo, baseada na resistência a fluorquinolonas, não foi observada neste estudo, uma vez que todas as amostras de *Staphylococcus* sp. avaliadas foram sensíveis a norfloxacin.

A resistência mediada por efluxo a fluoroquinolonas, como a norfloxacin, foi descrita em isolados clínicos de *S. aureus* nas últimas duas décadas, embora esporadicamente (GUIRAO et al., 2001; HORII et al., 2003; NOGUCHI et al., 2005). Na

região nordeste do Brasil, genes de sistema de efluxo foram detectados em cepas de *Staphylococcus* spp. isolados de vacas leiteiras, demonstrando a importância deste mecanismo de resistência na etiologia da mastite bovina na região (SILVA et al., 2020). Desta forma, embora os isolados deste estudo não tenham demonstrado a presença fenotípica de sistema de efluxo, a utilização de métodos moleculares para detecção desse mecanismo devem ser utilizados para melhor investigação sobre o perfil de resistência bacteriana na região do agreste paraibano.

CONCLUSÕES

A prevalência de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite de rebanhos leiteiros, na região do Agreste Paraibano, foi superior a 80% e está predominantemente envolvido nos casos de mastite subclínica, que atingiu 95% dos animais estudados. As cepas de *S. aureus* isoladas nesta pesquisa apresentaram elevada resistência ao antibiótico penicilina, mas demonstraram sensibilidade de 100% para sulfazotrim e gentamicina. Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos apontaram pouca variação nos perfis de resistência dos isolados. Isolados resistentes a penicilina e sensíveis às demais drogas testadas constituíram o padrão de resistência predominante. O fenômeno da múltipla resistência aos antimicrobianos não foi observado neste estudo, no entanto, a detecção fenotípica de MRSA é preocupante e métodos moleculares devem ser utilizados para melhor investigação.

Agradecimentos: Programa de pós graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, Paraíba. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES).

Declaração de conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

ALEKSHUN, M.N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell.**, v. 128, p. 1037-50, 2007.

BARBALHO, T.C.F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em

mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 1, n.2, 2001.

BARHEMA, H.W. et al. Invited review: the role contagious disease in udder health. **Journal of Dairy Science**, v.92, p. 4717-4729, 2009.

BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.1 p. 79-82, 2002.

BRITO, M.A.V.P. et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Juiz de Fora, v. 53, n.5, p. 531-537, 2001.

CARDOSO, H.F.T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.22, n.5, p.199-206, 2000.

CHAMBERS, H.F; DE LEO, F.R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 629-41, 2009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standards. 3rd ed. M31-A3. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.

COSTA, E.O. et al. Contagem de células somáticas de amostras de leite de glândulas mamárias de fêmeas bovinas em lactação infectadas por microrganismos dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. **Rev Napgama**, v. 8, n. 2, p. 3-7, 2005.

DAVID, M.Z; DAUM, R.S. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. **Clinical Microbiology Reviews**; n. 23, p. 616–87, 2010

DEMARCO, C.E. et al. Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3235-9, 2007.

DONATELE, D.M.; MOTTA, O.V.; FOLLY, M.M. Perfil antimicrobiano de linhagens de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na mastite subclínica de vacas leiteiras nas regiões norte e noroeste do Estado do Rio de Janeiro. **Revista NAPGAMA**, v.5, n.2, p.3-6, 2002.

DURAN, N. et al. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in *staphylococci*.

Indian Journal Medical Research, v. 135, n.3, p. 389-396, 2012.

FAGUNDES, H. et al. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 376-380, 2010.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.4, p.1315- 1320, 2004.

FRANCA, C.A. et al. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. from small ruminant mastitis in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.8, p. 747-753, 2012.

FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulante positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GUIRAO, G. Y. et al. Molecular diversity of quinolones resistance in genetically related clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and susceptibility to newer quinolones. **J Antimicrobial Chemotherapy**, v. 7, p. 157–61, 2001.

HORII, T. et al. Detection of mutations in quinolone resistance-determining regions in

levofloxacin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: effects of the mutations on fluoroquinolone MICs. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, p. 139–45, 2003.

LAFFRANCHI, A.; MULLER, E. E.; FREITAS, J. C. Etiologia das infecções intramamárias em vacas primíparas ao longo dos primeiros quatro meses de lactação. **Ciência Rural**, v.31, n.6, p.1027-1032, 2001.

LANGE, C. et al. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovinemastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p.127-141, 1999.

MELO, D. A. et al. Impairments of mecA gene detection in bovine *Staphylococcus* spp.

Brazilian Journal of Microbiology, v. 45, n. 3, p. 1075- 1082, 2014.

MU, Q. et al. Occurrence of sulfonamide, tetracycline, plasmid mediated quinolone and macrolide resistance genes in livestock feedlots in Northern china. **Environmental science and pollution research**, p. 9, 2014.

NOGUCHI, N. et al. Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 374–9. 2005.

OLIVEIRA, C. J. B. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Brazilian Dairy Farms and Identification of Novel Sequence Types. **Zoonoses and Public Health**, v. 63, n. 2, p. 97–105, 2016.

PIDDOCK, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded mul-tidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 382-402, 2006.

PITKÄLÄ, A. et al. Bovine mastitis in Finland – Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **Journal of Dairy Sciences**, v.87, p.2433-2441, 2004.

RABELLO, R. F. Susceptibilidade aos antimicrobianos e diversidade genética de amostras de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isoladas de casos de

mastite subclínica no estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 100 p. : il. 2003.

RABELLO, R. F. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from bovine mastitis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p.2111-2119, 2005.

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**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 19-23, 2003.

SANTOS, R. P. Identificação e caracterização de *Staphylococcus aureus* isolados de fossa nasal e glândula mamária de vacas leiteiras por diferentes métodos. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 75 p. : il. 2017.

SCHUKKEN, Y. H. et al. CNS mastitis: Nothing to worry about? **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 12, p. 9-14, 2009.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis, **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6203–6215, 2011.

SEARS, P.M; MCCARTHY, K.K. Management and treatment of *staphylococcal* mastitis.

Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, v. 19, n. 1, p. 171-85, 2003.

SILVA, D.M. Isolamento, caracterização e genômica comparativa de patógenos de mastite bovina. 2016. 89p. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) -Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.

SILVA, J. G. et al. Mastite bovina causada por *Staphylococcus* spp. resistentes à meticilina: revisão de literatura. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38 , n. 2, 2018.

SILVA, J.G. Perfil clonal, resistência antimicrobiana e atividade bactericida do Polipirrol

e extrato aquoso de *Moringa oleífera* em *Staphylococcus* spp. de leite, ambiente e ordenadores. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

SILVA, M. A. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 32p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, 32 p : il. 2008.

SILVEIRA-FILHO, V.M. et al. Molecular epidemiologic study of *Staphylococcus aureus* associated to bovine mastitis from Pernambuco state, Brazil. **Revista NAFGAMA**, v.8, n.1, p.12-17, 2005.

THORBERG, B. M. Coagulase-negative *staphylococci* in bovine sub-clinical mastitis. Licentiate thesis - Department of Biomedical Sciences and Veterinary Public Health, Swedish University of Agricultural Sciences, p. 1653-8315 , 2008.

UNESP - Universidade Estadual Paulista. **Estatística aplicada à ecologia usando o R**. Programa de Pós-Graduação Biologia Animal. São José do Rio Preto, SP Abril, 2011. Disponível em: <https://cran.r-project.org/doc/contrib/Provete-Estatistica_aplicada.pdf>. Acesso em: 24 de fevereiro de 2021.

VINTOV, J. et al. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine

Staphylococcus aureus from 10 countries. **Veterinary Microbiology**, v.95, p.133-147, 2003.

WHELEHAN, C. J. et al. Experimental *Staphylococcus aureus* infection of the mammary gland induces region - specific changes in innate immune gene expression. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.140. p.181-189, 2011.

ZADOKS, R. N. et al. Cow- and quarterlevel risk factors for *Streptococcus uberis* and

Staphylococcus aureus mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 12, p. 2649-63, 2001.