

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenciação e susceptibilidade a antimicrobianos de  
*Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de leite mastítico de 6  
propriedades rurais de Uberlândia-MG**

**Flaviana Ferreira Gomes**

Monografia apresentada à Coordenação do Curso  
de Ciências Biológicas, da Universidade Federal  
de Uberlândia, para a obtenção do grau de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia - MG  
Dezembro – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenciação e susceptibilidade a antimicrobianos de  
*Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de leite mastítico de 6  
propriedades rurais de Uberlândia-MG**

**Flaviana Ferreira Gomes**

**Profa Dra. Daise Aparecida Rossi**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas, da Universidade  
Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas

Uberlândia - MG

Dezembro - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenciação e susceptibilidade a antimicrobianos de  
*Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de leite mastítico de 6  
propriedades rurais de Uberlândia-MG**

**Flaviana Ferreira Gomes**

**Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi**  
**Faculdade de Medicina Veterinária**

Homologado pela coordenação do Curso de  
Ciências Biológicas em \_\_/\_\_/\_\_

**Profa. Dra. Cecília Lomônaco de Paula**  
**Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas**

Uberlândia - MG  
Dezembro - 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Diferenciação e susceptibilidade a antimicrobianos de  
*Staphylococcus coagulase positiva* isoladas de leite mastítico de 6  
propriedades rurais de Uberlândia-MG**

**Flaviana Ferreira Gomes**

Aprovado pela Banca Examinadora em:    /    /    Nota: \_\_\_\_\_

---

Profª. Dra. Daise Aparecida Rossi

---

Prof. Dr. Geraldo Batista Mello

---

Profª. Dra. Denise Von Dolinguer de Brito

Uberlândia, 16 de dezembro de 2005.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, que nunca me desamparou e nada me deixou faltar. Por estar sempre ao meu lado, oferecendo-me amor, carinho e compreensão. Aos meus familiares que sempre me apoiaram e ajudaram na minha caminhada, dando-me força e coragem para vencer os obstáculos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelas oportunidades e conquistas realizadas na minha vida. E por ter me dado familiares tão maravilhosos.

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dra. Daise Aparecida Rossi, por aceitar me orientar e me oferecer a oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO – UFU), pela ajuda no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a Cristiane Matoso Diniz pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e em meu amadurecimento profissional e acadêmico.

Agradeço à amiga Liliane Pinheiro pela paciência e ajuda na realização deste trabalho. Brigada Lili, adoro você!

Agradeço aos amigos da 56<sup>a</sup> Turma de Ciências Biológicas da UFU, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento como pessoa.

Agradeço aos amigos Juliana, Regina, Natássia, Héberly, Robson, Renata, Liliane, Bia, Gabriele, Tales e Antônio por me apoiarem e estarem sempre ao meu lado nos momentos alegres e tristes. Adoro vocês!!!

Agradeço meu tio Lopinho pela ajuda financeira, que sem ela a minha vida acadêmica seria mais difícil.

Agradeço minhas madrinhas Nilda e Alzira que me ajudaram nos momentos de indecisão e conflito. Amo vocês!!!

Agradeço minha mãezinha, que sempre me apoiou e me ajudou, não me deixando desistir nunca. Por estar sempre ao meu lado e nunca permitir a falta de nada (nem carinho nem bens materiais). MÃE TE AMO, você é a coisa mais importante da minha vida!!!

## RESUMO

Este trabalho possuiu por objetivos isolar *Staphylococcus* spp. de leite mastítico proveniente de 6 propriedades da região de Uberlândia–MG, identificar as espécies coagulase positiva por meio de provas bioquímicas e nestas, verificar o perfil de resistência aos antimicrobianos. Para caracterização de mastite subclínica 100 animais foram submetidos ao teste do CMT. A mastite clínica foi identificada visualmente em 43 animais. Para análise, o leite foi estriado em ágar manitol salgado e posteriormente as colônias submetidas a coloração de Gram, provas de catalase e coagulase. Espécimes coagulase positiva foram diferenciados pela produção de acetoina, atividade da  $\beta$ -galactosidase e utilização anaeróbica do manitol. A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada pelo teste de difusão em discos. *Staphylococcus* spp. foi isolado de 86,2% (75/87) das amostras, sendo 24 proveniente de mastite subclínica e 22 de mastite clínica, demonstrando que é o agente etiológico mais freqüente nas amostras analisadas. A utilização das provas bioquímicas foi adequada para diferenciar as espécies coagulase positivas, identificando os 75 espécimes isolados neste estudo. O perfil de resistência aos antimicrobianos determinados demonstra que esses microrganismos estão se tornando multirresistentes e representam um perigo potencial para a saúde animal e humana.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* coagulase positiva, mastite bovina, provas bioquímicas, resistência a antibióticos.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	5
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3. CONCLUSÃO	14
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15



## 1. INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma doença cosmopolita, de grande importância econômica, causada por grande número de microrganismos, principalmente bactérias que afeta as fêmeas de forma clínica ou subclínica (HIRSH; ZEE, 2003) e permanece sendo a doença de maior custo em rebanhos bovinos leiteiros (DETILLEUX, 2002).

Segundo Pyorala (2002) além de ser a doença mais importante em termos de perdas econômicas para a indústria leiteira, a mastite é a mais difícil de ser controlada. Estimativas feitas em vários países indicam perdas da ordem de 10% a 15% da produção devido à doença, sendo a redução na produção total, representada principalmente, pela mastite subclínica (SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2000), pois sua prevalência é maior que a da forma clínica. Além de prejuízos financeiros, a mastite pode causar graves problemas sociais fazendo com que o leite veicule patógenos para a população (HIRSH; ZEE, 2003).

Segundo Bramley; Cullor; Erskine (1996) a mastite pode ser causada por mais de 140 espécies diferentes de microrganismos, sendo que os principais agentes podem ser agrupados em contagiosos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Mycoplasma* spp., ambientais como *Escherichia coli*, *Klebsiela* spp. e estreptococos não-agalactiae e, oportunistas, como os estafilococos coagulase negativa.

Corrêa; Corrêa (1992) afirmam que os *Staphylococcus* são responsáveis por 55% a 60% dos casos de mastites. Os agentes etiológicos mais comuns são os *Staphylococcus* coagulase positiva (BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001, VIEIRA DA MOTTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001). Brito et al. (1996) examinando 6315 amostras de leite originárias de 1609 vacas de 48 rebanhos verificaram que os principais agentes etiológicos das mastites são o *Staphylococcus aureus* (19,2%) e os *Staphylococcus* coagulase negativas (12,4%). Vieira da

Mota; Folly; Sakyama (2001) encontraram alta prevalência (39,7%) de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite positivos no teste de CMT (California Mastitis Test).

*Staphylococcus aureus* é considerado um patógeno primário e tem sido o agente mais freqüentemente isolado tanto de infecções clínicas como subclínicas (BRAMLEY, CULLOR; ERSKINE, 1996; BRITO et al., 1999). Hirsh; Zee (2003) afirmam que outras espécies coagulase positivas não *S. aureus* também podem ser agentes infecciosos, como o *S. intermedius*, *S. hyicus* (facultativo), *S. xylosus* e *S. sauri*.

As espécies coagulase-negativas comumente isoladas de leite bovino são consideradas patógenos secundários e, em geral, causam reação inflamatória moderada na glândula mamária (HARMON; LANGLOIS, 1989; BRAMLEY, CULLOR; ERSKINE, 1996).

Vários métodos podem ser utilizados para isolamento e diferenciação de *Staphylococcus* em mastites. Os meios de cultura usualmente empregados para o isolamento primário são o ágar sangue, ágar Baird Parker (BP) e ágar manitol salgado. As colônias isoladas nesses meios podem ser diferenciadas dos estreptococos pela coloração de Gram e teste da produção de catalase. Os isolados que apresentarem morfologia típica de cocos Gram positivos agrupados em cachos e catalase positiva podem ser classificados como *Staphylococcus* spp. e podem ser divididos em dois grupos através da prova de coagulase, os coagulase positivos e os negativos (KLOOS; BANNERMAN, 1999; HIRSH; ZEE, 2003).

Historicamente, tem sido considerada como *S. aureus* a bactéria que apresenta resultado positivo no teste de coagulase em tubo após 4 horas de incubação (HARMON; EBERHART; JASPER, 1990). Entretanto, este procedimento não permite diferenciar *S. aureus* da espécie coagulase positiva *S. intermedius* e das variantes coagulase positivas de *S. hyicus*. Um teste adicional recomendado para diferenciar as espécies coagulase positivas é a produção de acetoína a partir de glicose ou piruvato que é positivo para *S. aureus* e negativo

para *S. intermedius* e *S. hyicus* (TALAN et al., 1989; HARMON; EBERHART; JASPER, 1990; KLOOS, 1990; KLOOS; BANNERMAN, 1999).

Além da produção de acetoína, provas bioquímicas como utilização anaeróbica do manitol e produção de  $\beta$ -galactosidase são úteis para diferenciar as espécies *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus* (KLOOS, 1990).

Os testes de produção de  $\beta$ -galactosidase e utilização anaeróbica do manitol são úteis porque o primeiro dá resultado positivo somente para *S. intermedius* e o segundo somente para *S. aureus* (KLOOS, 1990, ROBERSON et al., 1992, KLOOS; BANNERMAN, 1999). A diferenciação das 3 espécies pode ser observada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Diferenciação de *Staphylococcus* coagulase positiva por meio de provas bioquímicas.

	<b>Produção de acetoína</b>	<b>Utilização anaeróbica do manitol</b>	<b>Produção de <math>\beta</math>-galactosidase</b>
<i>S. aureus</i>	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	-	-	-

Fonte: KLOOS; BANNERMAN (1999)

*Staphylococcus* podem desenvolver resistência a vários antibióticos, inclusive a meticilina (PIRIZ et al., 1995). O uso indiscriminado de antibióticos, como acontece quando o agente etiológico não é identificado, pode favorecer o aparecimento de bactérias multirresistentes, o que, segundo Martins; Albuquerque; Matos (1998) agravam a resistência bacteriana em ambientes hospitalares humanos.

Brito et al. (2001) comprovaram que *Staphylococcus aureus* isolados de infecções intramamárias bovinas no Brasil (clínicas, subclínicas e crônicas), foram sensíveis a cefalotina, gentamicina, norfloxacin e oxacilina, 91% resistentes à tetraciclina e a tilosina e 65% a ampicilina e a penicilina G. Espécimes isolados em ambiente hospitalar humano tem mostrado perfil de multirresistência (SANTOS et al., 1999). Cerca de 50% dos

*Staphylococcus aureus* isolados por Sadoyama; Gontijo Filho (2000) apresentaram resistência a oxacilina, tendência confirmada por MARTINS; ALBUQUERQUE; MATOS (1998).

O leite é considerado como um dos mais nobres alimentos, dada a sua composição peculiar rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Contudo, ao lado da indiscutível qualidade intrínseca, há o permanente risco de servir como veiculador de patógenos (OLIVEIRA; FONSECA; GERMANO, 1999). Apesar dos estafilococos serem eliminados pela pasteurização, as toxinas produzidas são resistentes ao tratamento térmico (inclusive ao UHT) e às enzimas digestivas, o que representa um risco considerável à saúde humana (TORTORA, FUNKE; CASE, 2002).

Este trabalho possui por objetivos:

- isolar *Staphylococcus* spp. de leite mastítico proveniente de 6 propriedades da região de Uberlândia – MG;
- diferenciar os espécimes coagulase positiva isolados por meio de provas bioquímicas;
- verificar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos espécimes coagulase positiva.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Um levantamento foi realizado com o objetivo de identificar propriedades do município de Uberlândia onde havia relatos de mastite recorrente. A partir daí, em cada propriedade foi realizada a identificação dos animais em fichas próprias.

O teste California Mastitis Test (CMT) foi realizado em 100 vacas leiteiras em 6 propriedades rurais da região de Uberlândia-MG. As coletas foram realizadas no período de novembro de 2003 a abril de 2004. Concomitantemente, foram coletadas nas mesmas propriedades, 43 amostras de leite provenientes de animais com mastite clínica.

Para realização do teste de CMT, foram coletados 2 a 3mL de leite de cada quarto mamário, com o auxílio de uma bandeja padronizada e adicionados 2-3mL de reagente (detergente aniônico e púrpura de bromocresol). A leitura foi realizada na mistura, após movimentos giratórios lentos (CORRÊA; CORRÊA, 1992). O teste foi considerado positivo com a ocorrência de geleificação e mudança de cor da amostra, sendo interpretado como reações negativas, traços, 1, 2 ou 3 cruces, dependendo da intensidade da formação de gel na amostra (RIBEIRO, 1992).

O leite que apresentou resultado positivo no teste do CMT (2 ou 3 cruces), bem como o leite de animais com mastite clínica, foi coletado em tubo de ensaio estéril, após cuidadosa degermação (lavagem) do teto com água e sabão neutro e desprezo dos 3 primeiros jatos. Os tubos com o leite foram colocados em caixas isotérmicas com gelo e transportados diretamente ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram imediatamente analisados.

Para verificar se o agente etiológico da mastite era o *Staphylococcus* spp., o leite foi semeado com auxílio de alça de platina na superfície de placas de Petri com ágar manitol salgado, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas (KONEMAN et al., 1997). Após

incubação, as colônias foram repicadas em ágar nutriente por 24 horas para posterior identificação. A identificação foi realizada utilizando a coloração diferencial de Gram e prova da catalase.

A coloração de Gram foi realizada de acordo com recomendações de TORTORA, FUNKE; CASE (2002). O teste da produção de catalase foi realizado em lâmina, adicionando a uma colônia, gotas de peróxido de hidrogênio 3% e, considerado positivo, quando observado borbulhamento imediato (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

Os isolados que apresentaram morfologia típica de cocos Gram positivos e catalase positivos, foram considerados *Staphylococcus* spp. e, então, diferenciados em *Staphylococcus* coagulase positivos ou negativos através do teste da coagulase (Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT, 1991).

Para realização da prova de coagulase, foi transferido 0,2mL de cada cultura obtida em caldo BHI (Brain Heart Infusion), para tubo de 10x100 mm. Neste tubo, foi adicionado 0,5mL de plasma de coelho com EDTA (ácido etileno-diamino-tetra-acético) e, após homogeneização, incubado a 37°C. A leitura foi realizada pela observação a cada uma hora por até 24 horas (SILVA, JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997).

Os testes empregados para diferenciação das espécies coagulase positivas foram: produção de acetoina, utilização anaeróbica do manitol e produção de  $\beta$ -galactosidase (KLOOS, 1990).

A prova de produção de acetoina foi realizada em tubos com caldo à base de peptona e glicose. Após 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a primeira leitura, retirando-se 1,0mL da cultura e adicionando-se 0,6mL de  $\alpha$ -naftol a 5% (p/v) e 0,2mL de hidróxido de potássio a 40% (p/v). O resultado foi considerado positivo quando havia desenvolvimento de uma coloração vermelha e negativo quando desenvolvia a cor marrom. Quando o resultado era

negativo, os tubos eram mantidos em temperatura ambiente por mais doze dias e, neste período, realizadas leituras de maneira semelhante à primeira (BARROW; FELTHAM, 1995).

A utilização anaeróbica do manitol foi determinada de acordo com ROBERSON et al. (1992) com uma modificação. Ao invés de incubar por 5 dias, a incubação foi feita por 24 a 48 horas a 37°C. Eram considerados positivos os tubos que mudavam a coloração do indicador de vermelho para amarelo.

A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada de acordo com KONEMAN et al. (1989), empregando-se como substrato o ortonitrofenil galactosideo (ONPG), que é um composto estruturalmente semelhante à lactose. Suspensões das bactérias foram desenvolvidas em Ágar Tríplice Açúcar-Ferro (TSI) e posteriormente transferidas com auxílio da alça de platina para 0,5mL de solução fisiológica emulsionando até produzir uma suspensão abundante. Em seguida, era adicionado assepticamente, um disco de ONPG precedida de incubação a 37°C. As leituras eram realizadas por até 24 horas após incubação, sendo a primeira após 4 a 6 horas de incubação. O resultado era considerado positivo quando observa-se a presença de cor amarela. Um cultivo de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi usado como controle positivo (KLOSS; BANNERMAN, 1995).

Após identificação, foi verificada a susceptibilidade aos antimicrobianos dos *Staphylococcus* spp. isolados. A técnica utilizada foi a de difusão em Ágar Mueller-Hinton (BAUER et al., 1966; NCCLS, 1999). Foram testados os seguintes antimicrobianos e concentrações: penicilina G (10UA), ampicilina (10 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g), cefalotina (30 $\mu$ g), clindamicina (2 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), sulfazotrim (5 $\mu$ g), tetraciclina (30 $\mu$ g), rifampicina (5 $\mu$ g), cloranfenicol (30 $\mu$ g) e oxacilina (5 $\mu$ g). A amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controle.

A análise dos resultados foi realizada de forma descritiva. Os valores absolutos foram tabulados, calculados os respectivos percentuais e comparados aos dados disponíveis na literatura.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 100 animais submetidos ao teste do CMT, 44% (44/100) apresentaram resultados positivos, indicando presença de mastite subclínica. Nos 43 animais com sintomas de mastite clínica, 39 apresentaram positividade para *Staphylococcus* spp..

Apesar de aparentemente os resultados indicarem maior incidência de mastite clínica, discordando de diversos autores (FONSECA; SANTOS, 2000; SPINOSA; GORNIK; BERNARDI, 2000), deve-se observar que as coletas para CMT foram realizadas somente em animais que apresentavam episódios recorrentes, não configurando a totalidade dos animais das propriedades. No caso de mastite clínica, todos os animais sintomáticos tiveram seu leite analisado.

Das 44 amostras de leite positivas no teste CMT, 81,8% (36) foram classificadas como *Staphylococcus* spp., por apresentarem morfologia típica de cocos Gram positivos e catalase positiva. Nas 43 amostras provenientes de animais com mastite clínica, *Staphylococcus* spp. foram identificados em 90,7% (39).

Do total de 75 amostras identificadas como *Staphylococcus* spp., 61,3% (46/75) foram classificadas como coagulase positiva. Destas, 52,2% (24/46) foram provenientes de mastite subclínica e 47,8% (22/46) de mastite clínica (Tabela 2). Esta alta prevalência dos *Staphylococcus* spp. como agentes etiológicos das mastites estão de acordo com os relatos de CORRÊA; CORRÊA (1992), BRITO et al. (1996), BRITO et al. (1999), BRITO et al. (2001) e VIEIRA DA MOTA; FOLLY; SAKYIAMA (2001).

**Tabela 2.** Espécimes de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e negativa isoladas de seis propriedades rurais de Uberlândia – MG, no período de novembro de 2003 a abril de 2004.

	<i>Staphylococcus</i> spp. (n=75)	
	Mastite clínica (n=39)	Mastite subclínica (n=36)
Coagulase positiva	22	24
Coagulase negativa	17	12

Os 24 espécimes coagulase positivas isoladas do leite de animais mastite subclínica e diferenciados por identificação bioquímica (Tabela 3) demonstraram que 70,8% (17/24) eram *Staphylococcus aureus*, 16,7% (4/24) *S. intermedius* e 12,5% (3/24) *S. hyicus*. Os 22 espécimes coagulase positiva provenientes de mastite clínica foram identificados como: *Staphylococcus aureus* 68,2% (15/22); *S. intermedius* 27,3% (6/22) e *S. hyicus* 4,5% (1/22). A elevada prevalência da espécie *S. aureus* caracterizando-o como o principal agente etiológico das mastites, também foi relatada por vários autores (BRAMLEY, CULLOR; ERSKINE, 1996; BRITO et al., 1999; BRITO et al., 2001; VIEIRA DA MOTA; FOLLY; SAKYIAMA, 2001).

**Tabela 3.** Identificação de espécimes de *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de leite mastítico de 6 propriedades rurais de Uberlândia – MG, no período de novembro de 2003 a abril de 2004.

	coagulase	n	%	Produção de acetoína	Utilização anaeróbica do manitol	Produção de β- galactosidase
<i>S. aureus</i>	+	32	69,6	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	+	10	21,7	-	-	+
<i>S. hyicus</i>	+	4	8,7	-	-	-

O teste de produção de acetoína é de fácil execução, de baixo custo e considerado uma característica chave para a espécie *S. aureus* (KLOOS, 1990). Entretanto, apresenta a desvantagem de necessitar de incubação prolongada, o que retarda a obtenção do resultado e dificulta sua utilização na rotina diagnóstica. Empregando um teste semelhante ao utilizado neste estudo, TALAN et al. (1989) encontraram 100% de positividade em 14 amostras de *S. aureus* de origem canina e ROBERSON et al. (1992) verificaram 6% de amostras negativas em 80 amostras de *S. aureus* isoladas de diversas espécies de animais e do homem. A possibilidade de se obter resultados negativos para *S. aureus* nesta prova demonstra a necessidade de se empregar um outro teste além da acetoína e coagulase para diferenciar os

estafilococos coagulase-positiva isolados de mastite bovina (BRITO; CAMPOS; BRITO, 2002).

A fermentação anaeróbica do manitol é considerada também uma característica importante na identificação de *S. aureus*, com 90% ou mais das amostras apresentando reação positiva (KLOOS, 1990). Já a produção da enzima  $\beta$ -galactosidase é o teste mais indicado para diferenciar *S. intermedius* de *S. aureus*, pois os estudos têm demonstrado que 100% das amostras apresentaram positividade na reação para *S. intermedius*, enquanto que outras espécies *Staphylococcus* coagulase positiva não são capazes de produzir essa enzima (ROBERSON et al., 1992).

O *S. intermedius* tem sido isolado de diversas espécies animais, principalmente do cão (TALAN et al., 1989). Apesar do papel dessa espécie como agente da mastite bovina ser questionado, devido ao isolamento em rebanhos leiteiros ser muito baixo ou ausente (JASPER; INFANTE; DELLINGER, 1985; ROBERSON et al., 1992; ROBERSON; FOX; HANCOCK, 1996), dentre as amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva analisadas neste estudo, dez (21,7%) foram identificadas como *S. intermedius*.

As 4 amostras (8,7%) de *Staphylococcus* coagulase positiva identificadas como *S. hyicus* apresentaram resultados negativos na produção de acetoína, atividade de  $\beta$ -galactosidase e fermentação do manitol. Resultado semelhante foi encontrado em estudo realizado por BRITO; CAMPOS; BRITO (2002), que encontraram 22,4% (11/49) amostras identificadas como *S. hyicus*.

Das amostras identificadas como *Staphylococcus* spp. (Tabela 4) provenientes de mastite subclínica, 95,8% (23/24) apresentaram resistência à penicilina e ampicilina, 33,3% (8/24) a rifampicina, 12,5% (3/24) a clindamicina, tetraciclina e oxacilina, 8,3% (2/24) a ciprofloxacina, eritromicina, sulfazotrim, cloranfenicol, 4,2% (1/24) a cefalotina. Também foram observadas resistências intermediárias nos testes de susceptibilidade as drogas, com

45,8% (11/24) a eritromicina, 25% (6/24) ao cloranfenicol, 12,5% (3/24) a ciprofloxacina e clindamicina, 8,3% (2/24) a tetraciclina e 4,2% (1/24) a cefalotina.

Já o índice de resistência às drogas provenientes dos isolados de mastite clínica foram: 95,5% (21/22) a penicilina, 86,4% (19/22) a ampicilina, 81,8% (18/22) a eritromicina, 77,2% (17/22) a oxacilina, 72,7% (16/22) a rifampicina, 68,2% (15/22) a clindamicina, 27,3% (6/22) a cefalotina, 18,2% (4/22) a ciprofloxacina, 13,6% (3/22) a tetraciclina, 9,1% (2/22) ao sulfazotrim e cloranfenicol. Resultados intermediários também foram encontrados, com 22,7% (5/22) a cefalotina e clindamicina, 9,1% (2/22) a eritromicina e tetraciclina, 4,5% (1/22) a ciprofloxacina e cloranfenicol.

A penicilina é um dos antibióticos mais difundidos e utilizados no tratamento de enfermidades animais. Porém, nos resultados obtidos no teste de sensibilidade em discos, esta droga se mostrou pouco eficiente, pois das cepas coagulase positivas, pertencentes a animais com mastite subclínica, identificadas como *S. aureus* 94,1% (16/17) foram resistentes à penicilina e a ampicilina, 5,9% (1/17) a ciprofloxacina, cefalotina, clindamicina, eritromicina, sulfazotrim, cloranfenicol, oxacilina, 11,8% (2/17) a tetraciclina, 35,3% (6/17) a rifampicina. Estes resultados concordam com os realizados por Brito et al. (2001) que encontraram resistência a ampicilina e penicilina G em 65% das cepas e *Staphylococcus aureus* isoladas de infecções mamárias.

Das 15 cepas coagulase positivas, provenientes de animais com mastite clínica, identificadas como *S. aureus* 94,1% (14/15) foram resistentes a penicilina; 80% (12/15) a ampicilina e eritromicina, 13,3% (2/15) resistentes a ciprofloxacina, ao sulfazotrim e a tetraciclina, 26,7% (4/15) resistentes a cefalotina, 60% (9/15) resistentes a clindamicina, 66,7% (10/15) a rifampicina, 0% ao cloranfenicol, 73,3% (11/15) a oxacilina.

**Tabela 4.** Resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*, isolados de vacas com mastite recorrente e mastite clínica em seis propriedades rurais em Uberlândia – MG, 203 – 2004.

<i>Staphylococcus</i> spp.											
	PEN	AMP	RIF	CLI	TET	OXA	CIP	ERI	SLF	CLO	CFL
Subclínica	95,8%	95,8%	33,3%	12,5%	12,5%	12,5%	8,3%	8,3%	8,3%	8,3%	4,2%
Clinica	95,5%	86,4%	72,7%	68,2%	13,6%	77,2%	18,2%	81,8%	9,1%	9,1%	27,3%
<i>S. aureus</i>											
	PEN	AMP	RIF	CLI	TET	OXA	CIP	ERI	SLF	CLO	CFL
Subclínica	94,1%	94,1%	35,3%	5,9%	11,8%	5,9%	5,9%	5,9%	5,9%	5,9%	5,9%
Clinica	94,1%	80%	66,7%	60%	13,3%	73,3%	13,3%	80%	13,3%	0%	26,7%

PEN: penicilina G (10UA), AMP: ampicilina (10µg), CIP: ciprofloxacina (5µg), CFL: cefalotina (30µg), CLI: clindamicina (2µg), ERI: eritromicina (15µg), SLF: sulfazotrim (5µg), TET: tetraciclina (30µg), RIF: rifampicina (5µg), CLO: cloranfenicol (30µg) e OXA: oxacilina (5µg)

A resistência dos espécimes a oxacilina mostra-se preocupante e superior às observadas por Martins; Albuquerque; Matos (1998); Sadoyama; Gontijo Filho (2000) que encontraram 50% de resistência a oxacilina em espécimes isolados de ambiente hospitalar humano. É importante que a concentração inibitória mínima (CIM) seja estabelecida para os espécimes isolados das mastites e estudos moleculares sejam realizados para verificar a existência de genes de resistência. É possível que o uso indiscriminado de antibióticos na medicina veterinária seja responsável pelo nível de resistência observado neste estudo.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- *Staphylococcus* spp. foi isolado de 86,2% (75/87) das amostras, destas, 61,3% (46/75) foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo 52,2% (24/46) proveniente de mastite subclínica e 47,8% (22/46) de mastite clínica, demonstrando que é o agente etiológico mais freqüente nas amostras analisadas.

- A utilização das provas bioquímicas: produção de acetoina, produção de  $\beta$ -galactosidase e utilização anaeróbica do manitol são adequadas para diferenciar *Staphylococcus* coagulase positiva isoladas de mastites bovinas. Estas provas permitiram identificar os 75 espécimes isolados neste estudo.

- O perfil de resistência aos antimicrobianos determinados para os *Staphylococcus* coagulase positiva demonstra que esses microrganismos estão se tornando multirresistentes e representam um perigo potencial para a saúde animal e humana.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Contagem de *Staphylococcus aureus* em placa.** MB3464. 1991.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. A. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria.** Cambridge: Cambridge University, 1995. 331p.

BAUER, A.W.; KIRBY; W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, Aug. 1966.

BRAMLEY, A. J.; CULLOR, J. S.; ERSKINE, R. J. **Current concepts of bovine mastitis.** 4. ed., Madison: National Mastitis Council, 1996. 64p.

BRITO, J. R. F.; BRITO, M. A. V. P.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. **Mastite bovina de A a Z.** Sanidade do gado leiteiro. Coronel Pacheco: Embrapa /CNPGL, 1996. p. 7-14.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, p. 129-135, Apr. 1999.

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, Oct. 2001.

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. **Revista Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 79-82, Santa Maria, Jan./ Feb. 2002.

CORRÊA, W. M.; CORRÊA, C. M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1992. p. 117-131.

DETILLEUX, J. C. Genetic factors affecting susceptibility of dairy cows to udder pathogens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 88, n. 3-4, p. 103-110, Sep. 2002.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, SP: Lemos Editorial, 2000, 176p.

HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Mastitis due to coagulase-negative *Staphylococcus* species. **Agri-Practice**, v. 10, n. 1, p. 29-34, Jan. 1989.

HARMON, R. J.; EBERHART, R. J.; JASPER, D. E. **Microbiological proceduces for the diagnosis of bovine udder infection**. Arlington: National Mastitis Council, 1990. 34p.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, Guanabara Koogan, 2003. 446p.

JASPER, D. E.; INFANTE, F.; DELLINGER, J. D. Relationships among the results of coagulase, staphylococcal toxin, and thermonuclease tests on staphylococci from cow milk. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 582-584, Apr. 1985.

KLOOS, W. E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Supplement, v. 69, n. 19, p. 25S-37S, 1990.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical microbiology**. 7 ed. Washington: American Society of Microbiology, 1999. p. 264-282.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. P.; DOWELL Jr, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 2. ed., São Paulo: Panamericana, 1989. 730p.



KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. P.; DOWELL Jr, V. R.; SOMMERS, H. M. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5. ed., Philadelphia: Lippencott – Ravon, 1997. 1448p.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M.; MATOS, J. H. G. Isolamento e caracterização de bactérias de diferentes ambientes hospitalares. Perfil da sensibilidade a quimioterápicos. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 56, p. 45-48, Aug. 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. Approved Standard NCCLS document M2-A5, Villanova, PA, 1999.

OLIVEIRA, C. A. F.; FONSECA, L. F. L.; GERMANO, P. M. L. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 62, p. 10-16, Jun. 1999.

PIRIZ S., DE LA F.; VALLE J.; MATEOS E.; HURTADO M. A.; CID D.; RUIZ-SANTAQUITERIA J.A.; VADILLO S. Comparative in vitro activity of 11 B-lactam antibiotics against 91 *Staphylococcus intermedius* strains isolated from Staphylococcal dermatitis in dogs. **Journal of Veterinary Medicine**. v.42, p.293-300, 1995.

PYORALA, S. Nes strategies to prevent mastitis. **Reproduction in Domestic Animals**, Belfast, v. 37, n. 4, p. 211-216, Aug. 2002.

RIBEIRO, S. C. A. **Doenças bacterianas dos animais domésticos**. Centro de Ciências Biomédicas do Departamento de Medicina Animal de Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1992. não paginado.

ROBERSON, J. R.; C Evaluation of methods for differentiation of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3217-3219, Dec. 1992.

- ROBERSON, J. R.; FOX, L. K.; HANCOCK, D. D.; GAY, J. M.; BESSER, T. E.. Prevalence of coagulase-positive staphylococci, other than *Staphylococcus aureus*, in bovine mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 54-58, Jan. 1996.
- SADROYAMA, G.; GONTIJO FILHO, P. P. Risk factors for methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* infection in a Brazilian University Hospital. **Brazilian Journal of Infections Diseases**, Salvador, v. 4, n. 2, p. 135-1843, Mar./ Apr. 2000.
- SANTOS, K.R.N.; TEIXEIRA, L. M.; LEAL, G. S.; FONSECA, L. S.; GONTIJO FILHO, P. P. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated whit nosocomial acquisition in two Brazilian University Hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 17-23, Jan. 1999.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 1.ed., Varela, 1997. 295p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, 2.ed., Varela, 2001. 317p.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmalogia aplicada à Medicina Veterinária**, 2. ed, Guanabara Koogan, 2000. 646p.
- TALAN, D. A.; STAATZ, D.; STAATZ, A.; GOLDSTEIN, E. J. C.; SINGER, K.; OVERTURF, G. D. *Staphylococcus intermedius* in canine gingival and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recorgized zoonotic pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 78-81, Jan.1989.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**, 6.ed., Artmed, 2002. 827p.
- VIEIRA DA MOTTA, O.; FOLLY, M. M.; SAKYIAMA, C. C. H. Detection of different *Staphylococcus aureus* strains in bovine milk from subclinical mastitis using PCR and routine techniques. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 27-31, Jan./Mar. 2001.