

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS* SPP. EM MASTITE: UMA IMPORTÂNCIA EM SAÚDE ÚNICA

Thainá da Silva Pereira^{1*}, Pedro Pereira Ribeiro², Marcela Barlette Mendes³, Caio Nunes Christoffe Simões⁴, Mário Tatsuo Makita⁵, Thérèse Camille Nascimento Holmström⁶, Miliane Moreira Soares de Souza⁷

¹Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil – *Contato: thainap012@gmail.com

²Discente no Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

³Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

⁴Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

⁵Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

⁶Discente no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

⁷Docente titular no Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ – Seropédica/RJ – Brasil

INTRODUÇÃO

A mastite é a inflamação da glândula mamária em resposta a uma injúria causada mais frequentemente por agentes infecciosos^{1,4,6}, sendo as bactérias as maiores responsáveis⁶. A mastite estafilocócica é a causa mais comum da doença em todo o mundo, sendo também responsável pelas maiores perdas econômicas em detrimento da queda significativa na produção de leite¹. A resistência antimicrobiana do *Staphylococcus* spp. a Metecilina e a toda classe de beta-lactâmicos conferida pelo gene *mecA* e *blaZ* apresenta importante relevância clínica por limitar ou impossibilitar alternativas terapêuticas¹¹ no tratamento da mastite, além de gerar uma preocupação sobre o carreamento de genes de resistência. A OMS (2017) identificou *Staphylococcus aureus* metecilina resistente como uma superbactéria de prioridade de nível alto, gerando um alerta para as outras espécies em animais⁵. O objetivo deste trabalho foi identificar os isolados de *Staphylococcus* spp. e seu perfil de resistência bacteriana.

METODOLOGIA

Foram analisadas 127 amostras de leite coletadas de vacas leiteiras (pool dos quartos mamários de cada animal anteriormente a ordenha) em lactação de pequenos produtores rurais do estado de Rondônia, Rio de Janeiro e localidades adjacentes a baixada fluminense.

As amostras foram semeadas diretamente em Ágar Manitol Vermelho de Fenol (AMVF), para obtenção do isolamento primário e incubadas em estufa bacteriológica a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, sendo realizadas leituras com 24 e 48 horas. Os isolados compatíveis com cocos Gram-positivos foram submetidos ao teste de sensibilidade a bacitracina 0,04 UI (Figura 1) para diferenciação de *Staphylococcus* spp. e *Micrococcus* spp. Aqueles que apresentaram resistência foram testados quanto a produção de coagulase para distinção de Estafilococos coagulase-negativa (ECN) e Estafilococos coagulase-positiva (ECP). Os ECP foram submetidos a diferenciação de espécie pela observação de resistência ou sensibilidade à polimixina B.

Os isolados identificados fenotipicamente foram submetidos a identificação proteômica pela técnica do Tempo de Voo de Ionização / Desorção por Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF MS) pela Escola Paulista de Medicina (UNIFESP).

As cepas de *Staphylococcus* spp. foram submetidas ao teste de difusão em disco com os antimicrobianos cefoxitina (30 μg) e oxacilina (10 μg), penicilina G (10UI) e vancomicina (30 μg).



Figura 1: Antibiograma para teste de sensibilidade a bacitracina (0,04UI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 127 amostras de leite coletadas, foram isoladas e identificadas fenotipicamente 174 cepas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, sendo que do total de isolados, 54,6% (95/174) foram ECP e 45,4% (79/174) ECN.

Dentre as cepas classificadas como ECP, 37,9% (36/95) foram provenientes de amostras coletadas no estado de Rondônia e 62,1% (59/95) no Rio de Janeiro e propriedades localizadas nas divisas com os estados de São Paulo e Minas Gerais. Já os isolados identificados como ECN, foi observado cerca de 34,1% (27/79) e 65,9% (52/79), respectivamente (Gráfico 1).

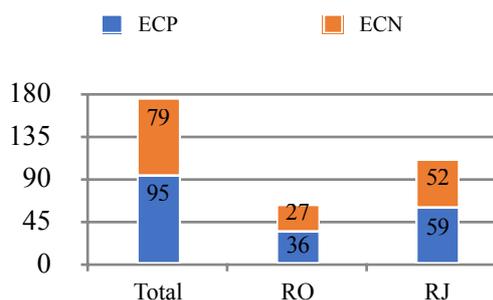
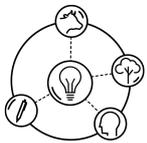


Gráfico 1: Gráfico da Identificação Fenotípica x Total de Isolados e região de coleta.

Quanto a identificação proteômica através da ferramenta MALDI-TOF, foi possível realiza-la em 96,5% das cepas isoladas (168/174). Dentre essas, 58,3% (98/168) foram confirmadas como *Staphylococcus aureus*, 15,47% (26/168) *S. chromogenes*, 7,14% (12/168) *S. haemolyticus*, 4,76% (8/168) *S. sciuri*, 3,57% (6/168) *S. saprophyticus*, 2,97% (5/168) *S. hyicus*, 2,38% *S. simulans*, 1,78% (3/168) *S. epidermidis*, 1,2% *S. kloosii* e *S. xylosum*, e 0,6% como *S. auricularis* e *S. warneri* (Gráfico 2).



Gráfico 2: Gráfico da proporção de cepas identificadas pelo MALDI-TOF de acordo com a espécie.



Quanto a detecção fenotípica de resistência antimicrobiana a penicilina, cefoxitina e oxaciclina, foi observada resistência a penicilina em 35,1% (59/168) das cepas identificadas. Analisando de acordo com a espécie, *S. aureus* apresentou 36,7% (36/98) das cepas resistentes a penicilina. Quanto as espécies de ECN, *S. chromogenes* demonstrou resistência em 19,2% (5/26) dos isolados, *S. haemolyticus* 25% (3/12), *S. saprophyticus* 66,6% (4/6), *S. sciuri* 75% (6/8), e *S. kloosii* (2/2), *S. warneri* (1/1) e *S. xylosum* (2/2) em 100% das cepas, respectivamente (Gráfico 3).

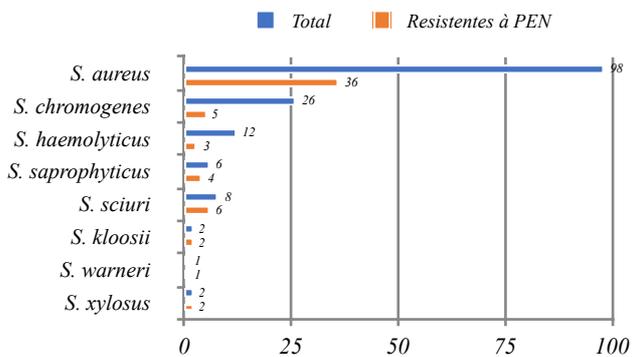


Gráfico 3: Gráfico do número de isolados resistentes à penicilina associado a identificação de cada espécie.

Com os resultados, observou-se que a prevalência das cepas encontradas são ECP e que a espécie *Staphylococcus aureus* foi a mais prevalente, representando 58,3% (98/168) em comparação com as demais espécies identificadas. Seguindo desta, as respectivas cepas de ECN *S. chromogenes* 15,47% (26/168) e *S. haemolyticus* 7,14% (12/168) foram prevalentes. É importante destacar que essas espécies geralmente estão associadas a ocorrência de mastite subclínica leve, porém tem apresentando quadros de mastite semelhantes ao provocadas por *S. aureus*⁹.

Nesse contexto, todos esses agentes provocam um alarme na saúde única por além de possuírem uma relevância clínica na mastite bovina, provocando prejuízos econômicos, acabam carregando genes de resistência, gerando uma situação emergencial num ramo da medicina veterinária e, conseqüentemente, na saúde pública global pela disseminação da resistência antimicrobiana.

Nesse estudo, analisou uma alta quantidade de cepas resistentes à penicilina 35,1% (59/168), a qual pode ser explicada pelo uso frequente ao longo dos anos, desse antibiótico, na bovinocultura³.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados nessa pesquisa correspondem com o que a literatura afirma, ou seja, que há predominância dos casos de mastite provocada pelo gênero *Staphylococcus* spp. Tal confirmação mostra como é relevante aprofundar os estudos sobre a mastite estafilocócica e principalmente sobre os genes de resistência que essas bactérias podem adquirir, uma vez que também foi analisado nessa pesquisa casos de resistência antimicrobiana à penicilina, provavelmente devido ao uso em larga escala nos sistemas de produção animal.

Atualmente, há uma alerta sobre a questão da resistência à penicilina e outras classes de antimicrobianos, uma vez que o tratamento da mastite causadas por agentes bacterianos se tornou um desafio, além de gerar uma preocupação com o potencial zoonótico e o risco em Saúde. Outros estudos para à detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos serão realizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHRAF, A.; IMRAN, M. **Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm.** Tropical animal health and production, v. 50, n. 6, p. 1193-1202, 2018.
2. CASTELLANO GONZÁLEZ, M.J.; PEROZO-MENA, A.J. **Mecanismos de resistencia a antibióticos beta-lactámicos en Staphylococcus aureus.** Kasmera, v. 38, n. 1, p. 18-35, 2010.
3. DORNELES, E. M. S. et al. **Genetic diversity and antimicrobiana resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcus isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil.** MicrobiologyOpen, v. 9, n. 5, 2018.
4. FONSECA, M. E. et al. **Mastite bovina: revisão.** Editora MV Valero. Pubvet, v. 15, n. 02, p. 1-18, 2021.
5. HOLMSTROM, T. et al. **Methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius: an underestimated risk at pet clinic.** Brazilian Journal of Veterinary Medicine, v. 42, n. 1, p. e107420-e107420, 2020.
6. KIBEBEW, K. **Bovine mastitis: a review of causes and epidemiological point of view.** Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, v. 7, n. 2, 2017.
7. LUCAS, A.P. et al. **Detection of β -lactamase, blaZ and mecA in penicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis in Garanhuns, Brazil.** Acta Veterinaria Brasilica, v. 15, n. 2, p. 140-145, 2021.
8. MELO, D. et al. **Characterization of Coagulase-Negative Staphylococci and pheno-genotypic beta lactam resistance evaluation in samples from bovine Intramammary infection.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 2, p. 368-374, 2018.
9. SENDER, G. et al. **Current concepts on the impact of coagulase-negative staphylococci causing bovine mastitis as a threat to human and animal health – a review.** Animal Science Papers and Reports, vol. 35, n. 2, p. 123-135, 2017.
10. SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. **Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio.** J. Bras. Patol. Med. Lab., v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.
11. WIELER, L. H. et al. **Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum β -lactamases (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in companion animals: nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples.** Internacional Journal of Medical Microbiology, vol 301, n 8, p. 635-641, 2011.

APOIO:

Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ): Apoio a Projetos Temáticos no Estado do Rio de Janeiro E-26/210.085/2020, Cientista do Nosso Estado E-26/202.604/2019, Projeto Redes de Resistência Antimicrobiana E-26/211.554/2019, Projeto Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico E-26/210.111/2022 e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) apoiaram este trabalho.

