

# PREVELÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE *Staphylococci* ISOLADOS DA VAGINA DE OVELHAS SADIAS

MARTINS, G.<sup>1\*</sup>; FIGUEIRA, L.<sup>2</sup>; BRANDÃO, F.<sup>2</sup>, PENNA, B.<sup>1</sup>; VARGES, R.<sup>1</sup>; LILENBAUM, W.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bacteriologia Veterinária, Universidade Federal Fluminense. Rua Prof. Ernani Pires de Melo, 101, 24210-130, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia Clínica e Reprodução, Universidade Federal Fluminense, Niterói/RJ, Brasil.

Palavras chave: *Staphylococcus*, ovelhas, vagina, antimicrobianos.

## 1. Introdução

O conhecimento a respeito da microbiota normal da vagina é de extrema importância para o diagnóstico e tratamento apropriado das enfermidades do trato reprodutivo nas diversas espécies. A vaginite é uma das doenças mais comuns quando se refere ao trato genital, e pode ser determinada por microrganismos que atuam como invasores oportunistas secundários (Suárez et al., 2006). Dentre estes, membros do gênero *Staphylococcus* tem sido citados, não só em ovelhas (Mavrogianni et al., 2007), mas também em outros ruminantes, como vacas (Williams et al., 2005) e cabras (Ababneh & Degefa, 2006). Tem sido demonstrado que *Staphylococcus aureus* é o microrganismo mais comum nos isolados de vaginite em ovelhas, e pode ocorrer associado a eritema severo, secreção purulenta e abundância de leucócitos na vagina (Donders et al., 2002). Amostras deste gênero têm sido isolados de genitália externa de ovelhas (Marshall et al., 1983), bem como de infecções intra-uterinas ascendentes (Mavrogianni et al., 2007), sendo capazes de promover morte embrionária. O gênero *Staphylococcus* apresenta um padrão altamente variável de susceptibilidade aos antimicrobianos, o que pode comprometer a eficácia da antibioticoterapia (Lilenbaum et al., 1999). Conseqüentemente, uma melhor compreensão das espécies dos *Staphylococci* que ocorrem na microbiota vaginal e de sua susceptibilidade aos agentes antimicrobianos pode contribuir para um manejo correto da vaginite, assim como de outras infecções do trato reprodutivo nas ovelhas.

## 2. Materiais e Métodos

2.1. *Animais* – Uma semana antes do início da estação de monta, 24 ovelhas multíparas da raça Santa Inês, do mesmo rebanho, foram classificadas como livres de doenças genitais após um histórico e exame físico detalhados. Animais com histórico recente de infecção no sistema reprodutivo ou que fizeram uso de antibiótico sistêmico ou local, nos últimos 60 dias, foram excluídos do estudo.

2.2. *Cultura Bacteriana* – Uma amostra foi colhida de cada animal, e com o auxílio de um swab estéril colheu-se as amostras da mucosa vaginal posterior, que foram encaminhadas para o laboratório em meio de transporte de Stuart (Merck). Swabs foram então semeados em Agar sangue bovino a 5% (Merck) e incubados à 37°C. Não se empregou metodologia para isolamento de bactérias anaeróbias. Se o crescimento ocorresse após 24 ou 48 horas de incubação, esfregaços eram feitos, corados pelo método de Gram e examinadas microscopicamente. Amostras com morfologia condizente com a de *Staphylococcus* sp. foram transferidas para o meio Agar-manitol-salgado (Merck).

2.3. *Identificação Bacteriana* – Após o crescimento, *Staphylococci* foram identificados com base nas características morfológicas de colônia, coloração de Gram, produção de pigmentos, hemólise e reações bioquímicas, incluindo prova da catalase, teste da coagulase em tubo de ensaio (com plasma de coelho), redução de nitrato, fosfatase, acetoina e arginina, resistência à novobiocina, e o teste da desoxiribonuclease. As espécies de *Staphylococcus* foram classificadas como descrito em estudos anteriores (Lilenbaum et al., 1999) e de acordo com o Manual Bergey's de Determinação Bacteriológica (Holt et al., 1994).

2.4. *Teste de sensibilidade aos antimicrobianos* – A susceptibilidade a um plantel de oito agentes antimicrobianos foi determinada através do método de difusão em disco no Agar Mueller-Hinton (Merck), de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (2003). Discos com penicilina G (10 U), gentamicina (10 µg), cefalotina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), nitrofurantoína (300 µg), ampicilina (10 µg), e amoxicilina (10 µg) foram testados. Após 24h de incubação, os diâmetros dos halos de sensibilidade foram mensurados e as amostras foram classificadas de acordo com o padrão de cada droga como sensíveis ou resistentes.

### 3. Resultados

3.1. *Prevalência Bacteriana* – Quinze isolados com características típicas do gênero *Staphylococcus* foram obtidos das 24 ovelhas (62,5% de crescimento positivo). Duas amostras não desenvolveram crescimento, e sete ovelhas apresentaram outros gêneros bacterianos, não considerados neste estudo (cinco bacilos Gram-negativos e dois bacilos Gram-positivos).

As espécies de *Staphylococcus* coagulase-positiva (CoPS) foram o grupo predominante, representando 60% dos isolados (nove amostras), todos classificados como *Staphylococcus aureus*. Espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativa (CoNS) foram isolados de seis animais, todas classificadas como *Staphylococcus epidermidis*.

3.2. *Susceptibilidade dos isolados aos agentes antimicrobianos* – A resistência aos antibióticos foi frequentemente observada, e 66,6% dos isolados (dez amostras) demonstraram resistência à pelo menos uma das drogas testadas. Resistência à penicilina G foi um achado comum e pôde ser observada em seis (40%) dos 15 isolados. Resistência a outras drogas foi também observada, onde quatro

amostras foram resistentes a ampicilina (26,6%), três à tetraciclina (20%), três para amoxicilina (20%) e duas para gentamicina (13,3%). Os agentes antimicrobianos mais efetivos contra os *Staphylococci* isolados da vagina de ovelhas sadias foram ciprofloxacina, perante a qual todos os isolados foram sensíveis, seguido por cefalotina e nitrofurantoína, com apenas uma amostra resistente cada.

Amostras de CoPS foram significativamente ( $p < 0,05$ ) mais resistentes aos antibióticos (77,7%) do que os CoNS (50%). Esse fenômeno foi particularmente mais evidente para a resistência à penicilina G ( $p < 0,05$ ), perante a qual 55,5% dos CoPS e 16,6% dos CoNS se mostraram resistentes.

#### **4. Discussão**

O conhecimento a respeito da microbiota normal tem sido reconhecido como um importante fator na elucidação da fisiopatologia de doenças em humanos e animais. Estes microrganismos normalmente não determinam processos infecciosos, mas na ocorrência de fatores predisponentes (como trauma ou infecção simultânea), alguns destes microrganismos podem multiplicar-se e causar doenças bacterianas (Holt et al., 1994).

Mudanças no ambiente da vagina podem promover alterações na microbiota, como a modificação do pH vaginal durante o estro ou gestação. Membros da microbiota podem atuar como oportunistas e exercer um importante papel no desenvolvimento de vaginite e outras infecções no trato reprodutivo superior, diminuindo o desempenho reprodutivo e conseqüentemente determinando importantes prejuízos econômicos (Suárez et al., 2006).

Este estudo confirma a presença de amostras estafilocócicas na microflora vaginal de ovelhas, evidenciada pelo isolamento de diferentes espécies de *Staphylococcus* da vagina de animais clinicamente saudáveis. A elevada ocorrência de membros deste gênero foi um achado esperado, visto que a presença de bactérias Gram-positivas na genitália externa de ovinos tem sido comumente reportada (Donders et al., 2002). Já o achado de nove amostras de CoPS é um muito importante, visto que estas bactérias são frequentemente relatadas em infecções purulentas agudas em humanos e animais (Holt et al., 1994). CoPS tem sido descritos em casos de vaginite e endometrite em ovelhas (Marshall et al., 1983) bem como em outros ruminantes como vacas (Williams et al., 2005) e cabras (Ababneh & Degefa, 2006). *S. aureus* é reconhecido ainda como agente de outras infecções em ovelhas tais como mastites e dermatites (Koutinas et al., 2007).

Considerando a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados neste estudo, alguns resultados inesperados e alarmantes foram observados. Visto que apenas animais sadios e sem histórico de tratamento recente com antibióticos foram incluídos, esperava-se que membros da microbiota normal da vagina fossem bastante susceptíveis às drogas antimicrobianas. Não obstante, 66,6% dos

isolados (dez amostras) demonstraram resistência à pelo menos uma das drogas testadas e somente um antibiótico (ciprofloxacina) foi efetivo contra todos os isolados. Um detalhado histórico clínico do rebanho não demonstrou uma exposição prévia a nenhum dos antibióticos testados que poderia justificar a taxa de resistência observada.

Há uma carência de estudos a respeito da susceptibilidade aos antimicrobianos dos *Staphylococci* da vagina de ovelhas; no entanto, nossos resultados concordam com estudos conduzidos em outros ruminantes. O padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus epidermidis* de origem bovina foi estudado por Nunes et al. (2007), no qual reportaram a alta resistência à penicilina G e baixa resistência para gentamicina. Uma elevada susceptibilidade destas bactérias para as cefalosporinas foi também notificada, o que está de acordo com nossos resultados com *Staphylococci* de origem ovina. É notável que *Staphylococci* isolados de diferentes espécies e em diferentes países possam apresentar uma resistência muito similar aos antimicrobianos, o que sugere que esta resistência possa ser inerente à população estafilocócica da vagina dos ruminantes. Veterinários de campo devem ter em mente estes resultados quando se depararem com infecções do trato reprodutivo de ovelhas, particularmente vaginites.

## 5. Conclusão

Concluindo, amostras de *Staphylococcus* foram isoladas de 62,5% das amostras colhidas em vagina de ovelhas sadias. Resistência aos antimicrobianos foi frequentemente observada nestes isolados, e ciprofloxacina foi a única droga totalmente efetiva contra estas amostras. Para uma melhor compreensão sobre o diagnóstico e tratamento das infecções do trato reprodutivo, o conhecimento sobre a ocorrência das diversas espécies desse gênero e seu padrão de resistência aos antibióticos torna-se primordial.

Organismo	Amostras Resistentes	Padrão de Resistência Antimicrobiana (Nº dos isolados)
<i>Staphylococcus aureus</i>	07/09 (77,7%)	PN (3); TE PN (1); AP AM TE CF GN (1); AP AM GN (1); AP (1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3/6 (50,0%)	AP AM PN (1); TE (1); NT PN (1)
<b>TOTAL</b>	10/15 (66,6%)	PN (3); TE PN (1); AP AM TE CF GN (1); AP AM GN (1); AP (1); AP AM PN (1); TE (1); NT PN (1)

AP - ampicilina. AM - amoxicilina. TE - tetraciclina. CF - cefalotina. GN - gentamicina. NT - nitrofurantoína CI - ciprofloxacina. PN - penicilina G.

## Referências bibliográficas

- Ababneh, MM, Degefa, T, 2006. Bacteriological findings and hormonal profiles in the postpartum Balady goats. *Reprod. Domest. Anim.* 41, 12-6.
- Donders, G.G.G., Vereecken, A., Bosmans, E., Dekeersmaecker, A., Salembier, G., Spitz, B., 2002. Definition of a type of abnormal vagina flora that is distinct from bacterial vaginosis, aerobic vaginitis. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 109, 34–43.
- Holt, J.C., Krieg, N.K., Sneath, P.H.A., Stanely, J.F., Williams, S.T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth ed. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Argyroudou, S., Koutinas, C.K., Karatzanos, P., Giadinis, N., 2007. Clinical, histopathological and therapeutic considerations in a flock of sheep with facial staphylococcal-associated dermatitis. *Vet. Dermatol.* 18, 211-6.
- Lilenbaum, W., Esteves, A.L., Souza, G.N., 1999. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. *Lett. Appl. Microbiol.* 28, 448-52
- Marshall, M.M., Songer, J.G., Chillelli, C.J., deVos, J.C., 1983. Isolations of aerobic bacteria from wild desert bighorn sheep (*Ovis canadensis nelsoni* and *O. c. mexicana*) in Arizona. *J. Wildl. Dis.* 19, 98-100.
- Mavrogianni, V.S., Amiridis, G.S., Gougoulis, D.A., Fragkou, I.A., Fthenakis, G.C., 2007. Efficacy of difloxacin for the control of postpartum uterine infections of ewes. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30, 583-5.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard 8th ed. Document M2-A8. NCCLS, Wayne, Pa.
- Nunes, S.F., Bexiga, R., Cavaco, L.M., Vilela, C.L., 2007. Technical note: Antimicrobial susceptibility of Portuguese isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in subclinical bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 90, 3242-6.
- Suárez, G., Zunino, P., Carol, H., Ungerfeld, R., 2006. Changes in the aerobic vaginal bacterial mucous load and assessment of the susceptibility to antibiotics after treatment with intravaginal sponges in anestrus ewes. *Small Rumin. Res.* 63, 39–43.

- Williams, E.J., Fischer, D.P., Pfeiffer, D.U., England, G.C., Noakes, D.E., Dobson, H., Sheldon, I.M., 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63, 102-17.