

## TESTE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA *in vitro* DE *Staphylococcus aureus* ISOLADOS NO LEITE DE CABRAS COM MASTITE

Data de aceite: 01/07/2020

Data de submissão: 05/05/2020

### Layana Mary Frota Menezes

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Ceará  
Sobral-CE

<http://lattes.cnpq.br/2339533639577467>

ID Lattes: 2339533639577467

### Fabíola Fonseca Ângelo

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Juiz de Fora- MG

<http://lattes.cnpq.br/6860318043034385>

ID Lattes: 6860318043034385

### Jefferson Filgueira Alcindo

Instituto Agrônômico de Pernambuco  
Sertânia-PE

<http://lattes.cnpq.br/0068486150074919>

ID Lattes: 0068486150074919

### Daniele Maria Alves Teixeira Sá

Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Ceará  
Sobral-CE

<http://lattes.cnpq.br/3394139792900445>

ID Lattes: 3394139792900445

### Viviane de Souza

Embrapa Caprinos e Ovinos  
Sobral-CE

<http://lattes.cnpq.br/9577974927346582>

ID Lattes: 9577974927346582

**RESUMO:** A mastite é uma das doenças mais comuns em propriedades leiteiras causando prejuízos, principalmente pela redução na produção de leite decorrente da invasão do agente infeccioso no epitélio secretor da glândula mamária. O uso de antibióticos adequados é uma importante ferramenta para o tratamento da enfermidade, sendo que deverão ser empregados de forma criteriosa, uma vez que a resistência bacteriana aos fármacos é a principal causa de falha de terapias. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de cabras, obtidas a partir de casos de mastite subclínica de um rebanho do Estado de Minas Gerais e São Paulo. Verificou-se que a penicilina foi o antimicrobiano que as cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência em ambos os estados, apresentando 55,56% e 83,33% de resistência nas cepas de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente. Os antibióticos ampicilina e rifampicina por sua vez, apresentaram 44,44% de resistência nas cepas de Minas Gerais e 83,33% nas cepas de São Paulo, respectivamente. O perfil de resistência à penicilina, seguido da ampicilina em Minas Gerais, e rifampicina em São Paulo foram predominantes, o que demonstra ineficácia desses antibióticos no tratamento da mastite nesses rebanhos.

## ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Staphylococcus aureus* ISOLATED FROM SUBCLINICAL MASTITIS CASES IN GOATS

**ABSTRACT:** Caprine mastitis is one of the most common diseases in dairy herds, causing damage mainly due to the decrease in milk production after the invasion of the infectious agent in the secretory epithelium of the mammary gland. The use of proper antibiotics is an important tool for the treatment of the disease. However, they should be used judiciously, since the main cause of failure in therapy is bacterial resistance to the drug. The present study aimed to evaluate the in vitro antimicrobial sensitivity profile of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk samples, obtained from cases of subclinical mastitis in a herd in the State of Minas Gerais and São Paulo. It was found that Penicillin was the antimicrobial that strains of *S. aureus* presented greater resistance in both states, presenting 55.56% and 83.33% resistance in the strains of Minas Gerais and São Paulo, respectively. The antibiotics Ampicillin and Rifampicin, in turn, showed 44.44% resistance in strains from Minas Gerais and 83.33% in strains from São Paulo, respectively. The profile of resistance to penicillin, followed by ampicillin in Minas Gerais, and rifampicin in São Paulo were predominant, which demonstrates the ineffectiveness of these antibiotics available in the treatment of mastitis in these herds.

**KEYWORDS:** antibiotic, treatment, public health

### 1 | INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma importante atividade no cenário do agronegócio brasileiro. O leite de cabra tem grande destaque na dieta humana devido aos benefícios que proporciona à saúde. Assim, como o leite das demais espécies, é um dos alimentos mais completos da natureza, considerando sua composição diversificada de nutrientes e por conter elementos essenciais ao organismo humano, sendo, portanto, um alimento de alto valor biológico. É uma mistura homogênea constituída, principalmente, por água, proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas e sais minerais. Mesmo apresentando composição básica entre as espécies, diferenças significativas, podem ocorrer nas concentrações desses constituintes devido a fatores, como alimentação, raça, estágio de lactação e infecções na glândula mamária, como a mastite, considerada uma das principais enfermidades na caprinocultura leiteira (CLAEYS ET AL., 2014).

A mastite é caracterizada como uma enfermidade que atinge a glândula mamária, provocando alterações quantitativas e qualitativas, principalmente no aumento do número de Células Somáticas (BAGGIO; MONTANHINI, 2017). Essas alterações contribuem para a diminuição na qualidade dos produtos lácteos, além de impactar na saúde pública, pois o leite pode veicular inúmeros micro-organismos capazes de ocasionar infecções e toxiinfecções alimentares (SILVA; SILVA; BETT, 2017).

A administração de antibióticos é amplamente utilizada para tratar animais com mastite, sendo muitas vezes administradas de forma indiscriminada, sem a prescrição de um médico veterinário. Um dos grandes problemas no tratamento com antibióticos está no uso excessivo dessas drogas e como consequência a resistência a drogas antibacterianas, a qual resulta na seleção de bactérias inerentemente resistentes, tornando-as predominantes e com capacidade de repassar seu material genético para células suscetíveis (QUINN et al., 2005).

O êxito na terapia das mastites vem sendo prejudicado pelo crescente número de cepas resistentes aos antimicrobianos utilizados inadequadamente e indiscriminadamente. Os testes de sensibilidade são indicados para identificar qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível prever a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação, e quando se acredita que o organismo causador pertença a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017).

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar os principais micro-organismos envolvidos na etiologia da mastite subclínica caprina, e determinar os padrões de sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus*, em amostras de leite obtidas em rebanhos de Minas Gerais e São Paulo.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção das amostras de leite

No período de outubro de 2015 de 2017 a novembro de 2018, foram obtidas 392 amostras de leite de metades mamárias, de um total de 97 animais pertencentes, às regiões de São Paulo-SP (n=180) e Minas Gerais-MG (n=212), respectivamente.

As características macroscópicas de coloração do leite, consistência, assim como a presença de sangue, grumos ou pus foram avaliadas eliminando-se os três primeiros jatos na caneca telada, para detecção de mastite clínica. Os animais que foram diagnosticados com mastite clínica foram tratados e não fizeram parte do experimento. Antes da coleta das amostras, todos os animais foram submetidos aos procedimentos básicos de boas práticas de higiene: antissepsia dos tetos antes da ordenha, utilizando-se uma solução antisséptica de iodo a 0,5%; secagem de cada teto com papel toalha absorvente; antissepsia dos tetos após a ordenha, utilizando-se uma solução antisséptica de iodo a 0,5% glicerinado.

Foram colhidas amostras de cada metade mamária das fêmeas (amostras individuais) de acordo com os procedimentos recomendados pelo National Mastitis Council (OLIVER et al., 2004), em tubos falcon esterilizados, contendo 2 mL a 5 mL de leite, para identificação bacteriana. Após as coletas, as amostras foram identificadas e acondicionadas em caixa de material isotérmico, contendo gelo reciclável e enviadas ao Laboratório de Microbiologia

da Embrapa Caprinos e Ovinos, para isolamento.

## 2.2 Isolamento e identificação das estirpes de *Staphylococcus* spp.

Para o isolamento e identificação das cepas de *Staphylococcus* spp. foi inoculado 0,01 mL de cada amostra de leite provenientes das metades mamárias das fêmeas, com auxílio de uma alça bacteriológica, e estriado diretamente em placas de petri, contendo ágar-sangue, preparado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e incubadas a 37 °C por 24 a 48 horas.

Posteriormente, foram levadas em consideração a morfologia e o número de colônias dos micro-organismos isolados e interpretados segundo critérios propostos por Cole Junior (1990) e Quinn et al. (2005) (Figura 1).

A seguir, com auxílio de uma alça bacteriológica 3 a 5 colônias foram inoculadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram-positivos e agrupados sob a forma de cachos de uva foram submetidas às provas de catalase, da coagulase livre e de produção de acetoina (VP) (MacFADDIN, 1976).



Figura 1. Colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp.

## 2.3 Teste de sensibilidade antimicrobiana

As cepas confirmadas como *S. aureus* foram submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966), em placas de ágar Mueller-Hinton, de acordo com as normas do National Committee For Clinical Laboratory Standards (2017).

Foram testados os antimicrobianos: Azitromicina (AZI 15); Cefoxitina (CFO 30); Ciprofloxacina (CIP 05); Clindamicina (CLI 02); Cloranfenicol (CLO 30); Eritromicina (ERI 15); Gentamicina (GEN 10); Linezolida (LNZ 30); Penicilina G (PEN 10); Rifampicina (RIF 05), Tetraciclina (TET 30) (Polisensidisc DME Gram Positivo) (Figura 3).



Figura 2. Halos de inibição formados após o período de incubação

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 392 amostras de leite analisadas foram isolados e confirmados bioquimicamente 143 (%) micro-organismos, sendo 6,3 (%) e 8,2 (%) cepas de *S. aureus*, dos rebanhos de Minas Gerais e São Paulo, respectivamente (Tabelas 1 e 2).

As tabelas 1 e 2 mostram que a penicilina foi o antimicrobiano que as cepas de *S. aureus* apresentaram maior resistência em ambos os estados, apresentando 55,56% de resistência nas cepas de MG e 83,33% nas cepas de SP, seguido por ampicilina (44,44%) em MG e rifampicina (83,33%) em SP.

Antibióticos	Sensível	(%)	Resistente	(%)	Intermediário	(%)
Ampicilina	05/09	55,56	04/09	44,44	0/09	0
Azitromicina	08/09	88,89	00/09	0	01/09	11,11
Ciprofloxacina	05/09	55,56	01/09	11,11	03/09	33,33
Clindamicina	04/09	44,45	02/09	22,22	03/09	33,33
Cloranfenicol	09/09	100	0/09	0	0/09	0
Eritromicina	02/09	22,22	01/09	11,11	06/09	66,67
Gentamicina	08/09	88,89	01/09	11,11	0/09	0
Cefoxitina	07/09	77,78	02/09	22,22	0/09	0
Linezolida	07/09	77,78	02/09	22,22	0/09	0
Penicilina G	04/09	44,45	05/09	55,56	0/09	0
Rifampicina	06/09	66,67	02/09	22,22	01/09	11,11
Tetraciclina	07/09	77,78	01/09	11,11	01/09	11,11
Sulfazotrim	08/09	88,89	01/09	11,11	0/09	0

Tabela 1. Perfil de sensibilidade *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite caprino a partir de casos de mastite subclínica em Minas Gerais.

Antibióticos	Sensível	(%)	Resistente	(%)	Intermediário	(%)
Ampicilina	03/6	50	03/6	50	0/6	0
Azitromicina	04/6	66,66	02/6	33,34	0/6	0
Ciprofloxacina	01/6	16,67	04/6	66,66	01/6	16,67
Clindamicina	0/6	0	04/6	66,66	02/6	33,34
Cloranfenicol	04/6	66,66	0/6	0	02/6	33,34
Eritromicina	0/6	0	03/6	50	03/6	50
Gentamicina	02/6	33,34	04/6	66,66	0/6	0
Cefoxitina	02/6	33,34	04/6	66,66	0/6	0
Linezolida	02/6	33,34	04/6	66,66	0/6	0
Penicilina G	01/6	16,67	05/6	83,33	0/6	0
Rifampicina	01/6	16,67	05/6	83,33	0/6	0
Tetraciclina	03/6	50	02/6	33,34	01/6	16,67
Sulfazotrim	04/6	66,66	02/6	33,34	01/6	16,67

Tabela 2. Perfil de sensibilidade *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite caprino a partir de casos de mastite subclínica em São Paulo.

Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram verificados por Castro et al. (2017) em estudo conduzido no estado de Minas Gerais, ao pesquisarem a sensibilidade antimicrobiana de 101 cepas de *S. aureus* isolados em amostras de leite de cabras com mastite subclínica, os quais apresentaram maior índice de resistência antimicrobiana aos antibióticos penicilina (73%), ampicilina (52,4%) e oxacilina (52,4%).

Salaberry et al. (2016) encontraram resistência de cepas de *S. aureus* isolados em amostras de leite de cabras com mastite subclínica, em São Paulo-SP, semelhantes ao presente estudo, sendo a maior resistência verificada para penicilina (81,8%), oxacilina (60,0%) e ampicilina (55,5%).

A resistência verificada no presente trabalho frente à penicilina, ampicilina e rifampicina em ambos estados, pode estar associada ao uso indiscriminado ou inadequado dos medicamentos, que acarreta índices elevados de resistência. A ausência de antibióticos intramamários para cabras faz com que muitas vezes opte-se pelo uso de antibióticos intramusculares de amplo espectro ou de antimastíticos idealizados para a espécie bovina, os quais possuem formulação para atuação em glândulas de dimensões superiores quando comparada com a glândula mamária caprina. Porém, a utilização dessas drogas proporciona um alto risco porque a segurança e eficácia destes produtos em cada espécie são desconhecidos (MAVROGIANNI et al., 2004).

#### 4 | CONCLUSÃO

O perfil de resistência à penicilina, seguido da ampicilina em Minas Gerais, e rifampicina em São Paulo foram predominantes, o que demonstra ineficácia desses

antibióticos disponíveis no tratamento da mastite nesses rebanhos. Sendo assim, é recomendado que os padrões de sensibilidade antimicrobiana dos patógenos isolados nos casos de mastites, sempre que possível, sejam determinados, para auxiliar aos médicos veterinários e proprietários na tomada de decisões e para a escolha do antimicrobiano ideal e específico e para cada caso.

## REFERÊNCIAS

- BAGGIO, A. P.; MONTANHINI, M. T. M. Qualidade de leite cru produzido na região do Norte Pioneiro do Paraná. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 2, p. 184-189, 2017.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n.4, p. 493-496, 1966.
- CASTRO, L. K.; LIMA, M. C.; PIFANO, N.K.; GUIMARÃES, S. H. S.; COSTA, S. L.; MOREIRA, M. A. S. Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* obtidos de mastite caprina. **Revista Científica Univiçosa** . v. 9, n. 1, p.481-482, 2017.
- CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOC, J.; UYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*, v. 42, p. 188-201, 2014. DOI: doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.01.045
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; Table: 2C. 27th ed. Wayne, PA: CLSI, 2017. (CLSI supplement M100).
- COLE JUNIOR, J. R. *Micrococcus and Staphylococcus*. In: CARTER, G. R.; COLE JUNIOR, J. R. (Ed.). **Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1990. p. 201-209.
- Mac FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1976. 312p.
- MAVROGIANNI, V.S.; ALEXOPOULOS, C. E.; FTHENAKIS, G.C. Field evaluation of flunixin meglumine in the supportive treatment of caprine mastitis. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.27, n.5, p. 373-375, 2004.
- OLIVER, S. P.; GONZÁLEZ, R.N; HOGAN, J.S.; JAYARAO, B.M.; OWENS, W.E. **Microbiological Procedures for the diagnostics of Bovine udder infection and determination of milk quality**. 4th ed. Verona: The National Mastitis Council, 2004. 47 p.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512 p.
- SALABERRY, S. R. S.; SAIDENBERG, A.B.S.; ZUNIGA, E.; GONSALES, F.F.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N. R. Análise microbiológica e perfil de sensibilidade do *Staphylococcus* spp. em mastite subclínica de caprinos leiteiros. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 336-244, 2016.
- SILVA, A. C.; SILVA, F. F.; BETT, V. A prevalência de mastites em vacas leiteiras do município de Carlinda (MT), no ano de 2016. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária E Zootecnia (PUBVET)**. v.11, n.8, p.761-766, 2017.