

Sensibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados no leite de cabras com mastite subclínica

Viviane de Souza¹
Patrícia Yoshida Faccioli Martins²
Daiane dos Santos Pinto³
Darciane Rodrigues Fernandes⁴
Adriano Rodrigues Lima⁵



Foto: Alex Miranda de Araújo

Introdução

A mastite é considerada uma das enfermidades que causam os maiores prejuízos à produção leiteira, devido à redução na quantidade e na qualidade do leite e derivados lácteos, custo com medicamentos, aumento da mão de obra e tempo de descarte do leite após o tratamento até a total eliminação dos resíduos de antibióticos utilizados. Representa também um fator significativo em saúde pública, pois ocorre eliminação de agentes etiológicos envolvidos e liberação de seus metabólitos no leite (COSTA, 1998; MAROGNA et al., 2012).

Vários agentes etiológicos podem causar mastite, sendo *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. os mais frequentemente diagnosticados. Dentro

do gênero *Staphylococcus*, estudos relatam que os estafilococos coagulase-negativos (ECN) são os micro-organismos predominantes na mastite subclínica (EBRAHIMI et al., 2010; ONNI et al., 2012). A espécie *Staphylococcus aureus* apresenta implicações importantes em saúde pública, uma vez que produzem enterotoxinas que sobrevivem aos tratamentos térmicos comumente aplicados ao leite, como a pasteurização, permanecendo inalterados nos produtos comercializados (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004; FREITAS et al., 2005; RADOSTITS, 2002).

A administração de antibióticos é amplamente utilizada para tratar animais com mastite, sendo muitas vezes administrados de forma indiscriminada, sem a prescrição de um médico-

¹Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

²Médica-veterinária, doutora em Medicina Veterinária Preventiva, pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

³Acadêmica de Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁴Tecnóloga em Alimentos, bolsista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

⁵Estatístico, especialista em Matemática Financeira e Estatística, analista da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE.

veterinário, proporcionando, conseqüentemente, a resistência a drogas antibacterianas, a qual resulta na seleção de bactérias inerentemente resistentes (QUINN et al., 2005).

Os testes de sensibilidade são indicados para 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).

Diversos métodos de sensibilidade *in vitro* de bactérias fornecem informações sobre quais agentes antimicrobianos apresentam os melhores resultados para a terapia da mastite. Na rotina laboratorial, a técnica mais utilizada é o antibiograma, por meio da difusão do antibiótico em disco, em que uma suspensão do micro-organismo é espalhada na superfície do meio de cultura e posteriormente o antimicrobiano impregnado em um disco de papel filtro é colocado sobre o meio de cultura previamente inoculado com a bactéria. A interpretação dos resultados se baseia no tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano formado ao redor do disco (BRITO et al., 2007).

Nesse sentido, o teste de sensibilidade a antibióticos é essencial no tratamento de mastites, pois define qual droga é mais eficaz em casos específicos de mastite, uma vez que a sensibilidade a uma determinada droga indica que, se a droga alcançar níveis terapêuticos nos tecidos afetados, a infecção causada pela bactéria pode responder ao tratamento (QUINN et al., 2005).

Sabendo-se que o êxito na terapia das mastites vem sendo prejudicado pelo crescente número de cepas resistentes aos antimicrobianos utilizado indiscriminadamente, bem como da importância da utilização da droga ideal e específica para cada caso, idealizou-se o presente estudo com o objetivo de avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de estirpes de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de cabras, obtidas a partir de casos de mastite subclínica de um rebanho do Estado do Ceará.

Metodologia

Nos meses de junho a julho de 2016, realizaram-se duas coletas de amostras de leite, de um total de 40 cabras das raças Saanen (n=20) e Anglo Nubiana (n=20), no terço médio da lactação, de cada metade mamária das fêmeas, totalizando 160 amostras, durante todo o experimento. As fêmeas, pertencentes ao rebanho do setor de caprinocultura da Embrapa Caprinos e Ovinos, eram criadas em condições de manejo semi-intensivo com períodos de pastejo na caatinga em pasto de capim gramão, alimentadas no cocho com feno de capim tifton e suplementadas com concentrado formulado para atender às exigências nutricionais dos animais em lactação segundo recomendado pelo National Research Council (NRC), concentrado formulado à base de milho, soja, cálcio e fósforo, ofertado 440 g de ração por animal ao dia durante todo o experimento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1981).

Realizou-se o exame clínico da glândula mamária e o teste da caneca, sendo que nenhum animal durante a execução do experimento apresentou diagnóstico de mastite clínica. Antes da coleta das amostras, todos os animais foram submetidos aos procedimentos básicos de boas práticas agropecuárias (BPA): antissepsia dos tetos antes da ordenha, utilizando uma solução desinfetante de iodo a 0,5%; secagem de cada teto com papel toalha absorvente e descartável; antissepsia dos tetos após a ordenha, utilizando uma solução desinfetante de iodo a 0,5% glicerinado.

Foram colhidas amostras 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 isolamento e identificação bacteriana. Essas amostras foram acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo gelo e levadas à Embrapa Caprinos e Ovinos.

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 24h. Após esse período, as colônias isoladas no ágar sangue foram observadas macroscopicamente quanto ao tamanho, morfologia, pigmentação e presença de hemólise. Em seguida, as placas contendo os isolados foram novamente incubadas a 37 °C por um período de 48 horas para realização de segunda leitura. Feito isso, três a cinco colônias foram semeadas em tubos com ágar nutriente inclinado e incubadas a 37 °C por 24h. Em seguida, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram e as culturas apresentadas em forma de cocos Gram positivos agrupados em arranjo de cacho de uva foram submetidas às provas bioquímicas de catalase, coagulase livre em tubo e de produção de acetoina. Os micro-organismos foram identificados a partir de subcultivos em placas de ágar soja-tripticaseína, de acordo com as recomendações de Cole Junior (1990), e Quinn et al. (2005) (Figura 1).

Foto: Viviane de Souza



Figura 1. Colônias sugestivas de *Staphylococcus* spp.

Teste de sensibilidade antimicrobiana

As estirpes confirmadas como *Staphylococcus aureus* foram submetidas aos testes de sensibilidade *in vitro* a partir da técnica de difusão em disco (BAUER et al., 1966). Utilizaram-se os seguintes 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). A partir de uma cultura da cepa selecionada, foi semeada uma única colônia em caldo BHI e incubada a 37 °C por aproximadamente 18 horas. Em seguida após turvação do meio, com suabe estéril previamente mergulhado na suspensão bacteriana, a cultura foi semeada por meio de estrias nas placas de Ágar Mueller Hinton em duas direções ou mais, por toda a superfície do meio e passando no final o suabe em toda a volta da placa, deixando-se secar o inóculo durante 5 a 10 minutos. Com a utilização de uma pinça estéril, os discos dos antimicrobianos testados foram colocados delicadamente sobre as placas, exercendo ligeira pressão para assegurar um perfeito contato com o ágar. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A inibição foi medida conforme o tamanho dos halos formados ao redor do disco, com auxílio de um paquímetro com unidade de medida mm. A interpretação dos halos de inibição foi realizada de acordo com as normas do National Committee For Clinical Laboratory Standards (2003), conforme demonstrado na Figura 2.



Foto: Viviane de Souza

Figura 2. Placas com os halos de inibição bacteriana.

Quanto aos aspectos éticos na experimentação animal, as atividades realizadas no presente documento foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos (CEUA/CNPC), em reunião realizada em 23/06/2015, Protocolo nº 004/2015.

Resultados

Entre as 160 amostras avaliadas durante o estudo, verificou-se que em 23 (14,4%) amostras houve isolamento de micro-organismos, sendo confirmados bioquimicamente 19 (82,6%) cepas de estafilococos coagulase-negativos e 4 (17,4%) de *Staphylococcus aureus*.

O predomínio de cepas isoladas de estafilococos coagulase-negativo (ECN) pode ser justificado pela presença dessas bactérias na microbiota da pele e conjuntiva dos animais, particularmente no úbere de fêmeas leiteiras. Esses resultados se assemelham a outros trabalhos científicos que afirmam que estafilococos coagulase-negativos (ECN) são os agentes patogênicos que mais causam a mastite subclínica em caprinos (MORONI et al., 2005; ONNI et al., 2012).

Verificou-se que os antimicrobianos aos quais as cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram maior resistência, foram a penicilina e rifampicina, sendo que todas as quatro cepas estudadas apresentaram 100% de resistência a essas duas substâncias (Tabela 1).

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

Antibiótico	Sensível	(%)	Resistente	(%)	Intermediário	(%)
Azitromicina	1 / 4	25,0	2 / 4	50,0	1 / 4	25,0
Ciprofloxacina	2 / 4	50,0	1 / 4	25,0	1 / 4	25,0
Clindamicina	2 / 4	50,0	2 / 4	50,0	0 / 4	0
Cloranfenicol	2 / 4	50,0	0 / 4	0	2 / 4	50,0
Eritromicina	0 / 4	0	3 / 4	75,0	1 / 4	25,0
Gentamicina	2 / 4	50,0	2 / 4	50,0	0 / 4	0
Cefoxitina	2 / 4	50,0	2 / 4	50,0	0 / 4	0
Linezolida	2 / 4	50,0	2 / 4	50,0	0 / 4	0
Penicilina G	0 / 4	0	4 / 4	100,0	0 / 4	0
Rifampicina	0 / 4	0	4 / 4	100,0	0 / 4	0
Tetraciclina	0 / 4	0	3 / 4	75,0	1 / 4	25,0

A resistência verificada no presente trabalho frente à penicilina e rifampicina pode estar associada ao uso indiscriminado dos antibióticos na terapia da mastite caprina na propriedade estudada.

De acordo com Garino Júnior et al. (2011) a penicilina é comumente utilizada no tratamento

de mastite caprina e seu uso prolongado acarreta índices elevados de resistência e favorece a redução da sua eficácia.

Outro fator verificado no presente estudo foi a presença de múltipla resistência, resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados das cepas de *Staphylococcus aureus* que apresentaram multirresistência.

Cepas	AZI	CIP	CLI	CLO	ERI	GEN	CFO	LNZ	PEN	RIF	TET
1	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	I
2	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R
3	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	R
4	I	S	S	S	I	S	S	S	R	R	R

AZI:Azitromicina;CIP:Ciprofloxacina;CLO:Cloranfenicol;ERI:Eritromicina;GEN:Gentamicina;CFO:Cefoxitina;LNZ:Linezolida;PEN:Penicilina;RIF:Rifampicina;TET:Tetraciclina.R:Resistente;I:Intermediário;S:Sensível.

Nesta pesquisa, observou-se que as cepas 1 e 2 de *Staphylococcus aureus* apresentaram resistência a oito antimicrobianos. Esse fator representa um motivo de preocupação, uma vez que muitos antimicrobianos disponíveis no mercado não teriam efeito sobre tais micro-organismos, o que poderia acarretar dificuldade no tratamento dos animais doentes.

Tais achados indicam a necessidade da adoção de medidas de Boas Práticas Agropecuárias para o controle da mastite, como:

- Estabelecimento de uma linha de ordenha, em que os animais saudáveis devem ser ordenhados antes dos animais infectados.
- Lavagem das mãos do ordenhador, o qual deverá seguir regras básicas de higiene.
- Realização do teste da caneca telada ou de fundo escuro, para retirada dos primeiros jatos de leite e detecção de cabras com mastite clínica, por meio da observação do leite, verificando se possui anormalidades, como flocos, grumos, pus ou sangue.
- Antissepsia dos tetos antes da ordenha, utilizando uma solução desinfetante (pré-dipping), devidamente registrada no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).
- Secagem de cada teto com papel toalha absorvente e descartável.
- Antissepsia dos tetos após a ordenha, utilizando uma solução desinfetante (pós-dipping), devidamente registrada no MAPA.

- Manutenção dos animais de pé, após a ordenha, para que o esfíncter do teto se feche e evite a entrada de micro-organismos para a glândula mamária.
- Lavagem e higienização das instalações, utensílios e equipamentos com água corrente e de boa qualidade.

Conclusões

Os resultados obtidos ressaltam a importância da avaliação da sensibilidade antimicrobiana *in vitro* para cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de casos de mastite, antes da indicação do tratamento para os animais, para dificultar a seleção de estirpes resistentes.

Referências

- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TUCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493 - 496, 1966.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. **Antibiograma**. In: EMBRAPA. Agência de Informação Embrapa. **Agronegócio do leite**. Brasília, DF, 2007. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_208_21720039247.html>. Acesso em: 19 dez. 2017.
- 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.

COSTA, E. O. da. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada do Centro Regional de Medicina Veterinária e Zootecnia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 3-9, 1998.

EBRAHIMI, A.; SHAMS, N.; SHAHROKH, S.; MIRSHOKRAEI, P. Characteristics of staphylococci isolated from mastitic goat milk in Iranian dairy herds. **Veterinary World**, v. 3, n. 5, p. 205-208, 2010.

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

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M., RABELO, S. D. A., SILVA, D. D., SILVEIRA FILHO, V. D.; SANTOS, F.G.B.; SENA, M.J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.

GARINO JUNIOR, F.; CAMBOIM, E. K. A.; NEVES, P. B. das; SÁ, A. V. V. de; ALMEIDA, A. P. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no Semiárido paraibano. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 1, p. 103-107, jan./mar. 2011.

MAROGNA, G.; PILO, C.; VIDILI, A.; TOLA, S.; SCHIANCHI, G.; LEORI, S. G. Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 102, n. 1, p. 74-83, Jan. 2012.

MORONI, P.; PISONI, G.; ANTONINI, M.; RUFFO, G.; CARLI, S.; VARISCO, G.; BOETTCHER, P. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus*

epidermidis isolated from two Italian goat herds. **Journal Dairy Science**, v. 88, n. 5, p. 1694-1704, May, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; approved standard. 8th ed. Wayne, PA, 2003. (NCCLS document M2-A8).

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Subcommittee on Goat Nutrition. **Nutrient requirements of goats**: angora, dairy, and meat goats in temperate and tropical countries. Washington, DC: National Academy Press, 1981. 91 p. (Nutrient requirements of domestic animals, 15).

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 edition. Verona: The National Mastitis Council, 2004. 47 p.

ONNI, T.; VIDILI, A.; BANDINO, E.; MAROGNA, G.; SCHIANCHI, S.; TOLA, S. Identification of coagulase-negative staphylococci isolated from caprine milk samples by PCR-RFLP of groEL gene. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 104, n. 1/3, p. 185-190, May, 2012.

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.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**: tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e equinos. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan, 2002. 1737 p.

Comunicado Técnico, 167

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos e Ovinos

Endereço: Fazenda Três Lagoas, Estrada Sobral/Groaíras, Km 4. Caixa Postal 145. CEP 62010-970. Sobral - CE.

Fone: (88) 3112-7400

Fax: (88) 3112-7455

SAC: www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

On-line (2017)

CGPE 14.333

SISGEN/CNPC A805A37

**Comitê de Publicações**

Presidente: Vinícius Pereira Guimarães

Secretário-Executivo: Alexandre César Silva Marinho

Membros: Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diônes Oliveira Santos, Maira Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Tânia Maria Chaves Campelo, Viviane de Souza.

Expediente

Supervisão editorial: Alexandre César Silva Marinho

Revisão de texto: Carlos José Mendes Vasconcelos

Normalização: Tânia Maria Chaves Campelo

Editoração eletrônica: Maira Vergne Dias