

Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica

Keicy Sandy Silvestre de Souza*¹, Yvana Camila de Moraes Oliveira¹, Ana Flávia Vieira Duarte¹,
Thiago Caldeira de Oliveira¹, Álvaro Luís de Carvalho Veloso², Priscilla Maria Carvalho
Oliveira², Núbia da Silva Ferreira Fernandes³

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade dos agentes causadores de mastite subclínica em vacas leiteiras aos antimicrobianos. O estudo foi realizado com 150 vacas em lactação de quatro fazendas na região Bocaiúva - MG. As amostras de leite foram coletadas a partir do quarto mamário positivo para o teste CMT, que apresentavam indicação de mastite subclínica. As amostras foram enviadas para o laboratório de microbiologia das Faculdades Integradas do Norte de Minas - Funorte, onde sofreu a cultura bacteriana e a técnica de difusão em discos. Em 51 amostras de leite, 31 (60,78%) foram positivas para exame microbiológico, uma detectada como *Streptococcus* spp., Quatro como Bacilos Gram negativo e 26 como *Staphylococcus* spp. Entre os antimicrobianos testados para *Staphylococcus* spp. a gentamicina foi mais eficaz com 96,15% de sensibilidade, seguido pela amicacina e cefalexina, que mostraram uma sensibilidade de 92,31%. Penicilina G apresentou menor sensibilidade com a resistência 73,08%. Entre os 26 isolados bacterianos testados, 26,92% apresentaram um índice de resistência múltipla antibióticos (MAR) $\geq 0,2$. A gentamicina, amicacina e cefalexina, são os antimicrobianos mais eficientes para o tratamento da mastite subclínica em vacas leiteiras na região de Bocaiúva - MG.

Palavras-chave: Exame microbiológico. Leite. *Staphylococcus* spp. Teste do CMT.

Antimicrobial resistance of bacteria isolated from dairy cows with subclinical Mastitis

Abstract

The objective of this study was to evaluate the sensitivity of the causative agents of subclinical mastitis in dairy cows to antimicrobials. The study was carried out with 150 lactating cows from four farms in the region of Bocaiúva - MG. Milk Samples were collected from the positive mammary quarter to CMT test, which showed indication of clinical mastitis. Samples were sent to the microbiology laboratory of the Integrated Colleges of the North of Minas Gerais - FUNORTE, where it underwent the bacterial culture and the diffusion technique on discs. In 51 milk samples, 31 (60.78%) were positive for microbiological examination, one detected as *Streptococcus* spp., four as Bacilos Gram negative and 26 as *Staphylococcus* spp. Among the antimicrobials tested for *Staphylococcus* spp. the gentamicin was more effective

¹Médico(a) Veterinário(a) egressa das Faculdades Integradas do Norte de Minas – FUNORTE.

*Autora para correspondência: keicysandy@yahoo.com.br

²Docente das Faculdades Integradas do Norte de Minas – FUNORTE

³Acadêmica do Curso de Graduação em Farmácia das Faculdades Integradas do Norte de Minas – FUNORTE.

Recebido para publicação em 20 de julho de 2016

Aceito para publicação em 23 de agosto de 2016

with 96.15% of sensitivity, followed by the amikacin and cephalexin that showed a sensitivity of 92.31%. Penicillin G showed less sensitivity with 73.08% resistance. Between the 26 bacterial isolates tested, 26.92% showed a multiple antibiotic resistance index (MAR) ≥ 0.2 . The gentamicin, amikacin and cephalexin, are the most efficient antimicrobial for the treatment of subclinical mastitis in dairy cows in the region of Bocaiúva - MG.

Keywords: Microbiological examination. Milk. *Staphylococcus* spp. CMT test.

A mastite bovina, é a principal doença que os produtores de leite do mundo enfrentam em virtude do impacto na produtividade dos rebanhos leiteiros e dos gastos referentes ao tratamento que, na grande maioria, é feito de forma empírica e errônea. Possui alta prevalência, proporciona perdas econômicas para a indústria, devido às alterações ocorridas na composição do leite que irá interferir na qualidade e produção de derivados e apresenta-se como um grande risco para a saúde pública por ser, o leite, um potencial veículo de diversos patógenos que podem causar distúrbios alimentares (BANDOCH; MELO, 2011; BARLOW, 2011; LOPES; LACERDA; RONDA, 2014).

Sua etiologia tem envolvimento com múltiplos patógenos, entretanto o mais estudado e isolado em todo o mundo, em relação à resistência antimicrobiana, são bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. Isso se deve a sua ação prolongada no hospedeiro, o que pode ocasionar infecção crônica, aumentando a dificuldade do tratamento e a cura. Também produz exotoxinas que alteram as características organolépticas do leite (BANDOCH; MELO, 2011).

A terapia antimicrobiana objetiva fazer com que o princípio ativo chegue até o local da infecção e mantenha concentrações adequadas por tempo satisfatório para auxiliar a defesa do sistema imunológico e reduzir recidiva (COSTA, 2011). O acesso facilitado aos medicamentos tem feito com que sejam escolhidos de maneira errônea o que pode resultar em seleção de cepas resistentes interferindo na eficiência do tratamento (COSTA, 2010; SHI et al., 2010).

O diagnóstico microbiológico da mastite oferece resultados precisos ao veterinário na identificação do problema do rebanho e permite a tomada de decisão eficaz quanto à escolha do antimicrobiano (LANGONI et al., 2009). Os testes de sensibilidade (antibiograma) são indicados quando há qualquer tipo de processo infeccioso que exija antibioticoterapia e/ou quando a espécie bacteriana apresenta resistência às

bases comumente utilizadas.

O objetivo deste estudo foi identificar agentes bacterianos presentes em leite de vacas com mastite subclínica em propriedades rurais da região de Bocaiúva - MG e avaliar a resistência in vitro aos antimicrobianos recomendados para tratamento da enfermidade.

O estudo foi desenvolvido em quatro fazendas localizadas na região de Bocaiúva - MG, que está geograficamente à 17° 06' 28" Sul de latitude, 43° 48' 54" Oeste de longitude e 698 m de altitude, apresenta um clima tropical semiárido, quente e seco, com período de chuvas concentradas entre os meses de outubro a março (MENDES, 2011). A população analisada foi composta por 150 vacas leiteiras mestiças de Holandês e Gir Leiteiro, em diferentes estágios de lactação, criadas em sistema semi-intensivo, com dieta a base de alimento concentrado e volumoso e ordenhadas, em ordenha mecânica, duas vezes ao dia e positivas para mastite subclínica de acordo com ao teste de CMT (SCHALM; NOORLANDER, 1957).

Para o procedimento de coleta das amostras, as vacas em lactação foram conduzidas a sala de ordenha, realizou-se a assepsia dos tetos com solução comercial com cloro (*pré-dipping*) por 30 segundos, depois enxugou-os com papel toalha e por fim, foi feita a desinfecção do teto com álcool etílico 70%GL. Após o descarte dos três primeiros jatos, coletou-se dez ml de leite, diretamente do teto afetado, em tubos de ensaio com rolhas estéril. Realizada as coletas os tubos foram identificados acondicionados em caixas isotérmicas com gelo reciclável, (SIMÕES et al., 2013) e encaminhados para o laboratório de microbiologia da Faculdades Unidas do Norte de Minas – FUNORTE, onde procederam-se a análises laboratoriais, dentro do prazo de 24 horas, para identificação do patógeno e avaliação da resistência dos isolados identificados aos antimicrobianos.

Para a realização da análise as amos-

tras foram previamente preparadas em ágar sangue bovino desfibrinado à 5% e incubadas a 37°C por 24-48 horas, quando foi feita a primeira e segunda leitura respectivamente, onde foi observado as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, colorações presença de hemólise e as características morfotintoriais pelo método de Gram (QUINN *et al.*, 2005).

Em seguida, de acordo com a metodologia descrita por Bauer *et al.* (1966), cinco colônias com morfologias semelhantes e identificadas pelas características morfotintoriais, foram colhidas com auxílio de uma alça de platina e transferidas para um tubo de ensaio contendo 4 ml de solução fisiológica 9%, onde foram encubadas até atingir a turvação de 0,5 na escala de Mc Farland com concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Dez minutos após o ajuste de suspensão bacteriana, foi introduzida uma alça de platina comprimida contra a parede do tubo a fim de retirar o excesso do inóculo, que foi semeado de forma homogênea em três direções diferentes por toda a superfície da placa de Petri em meio ágar Müeller-Hinton.

Segundo a técnica de difusão em discos padronizada pelo NCCLS (2012a), foram testados os seguintes discos antimicrobianos: amicacina (30µg), cefalexina (30µg), eritromicina (15µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), norfloxacin (10µg), penicilina G (10 UI), rifampicina (5 µg), sulfonamida (300 µg) a tetraciclina (30µg), trimetoprim (5 µg) e vancomicina (30 µg), colocados equidistantes, e com o auxílio de uma pinça estéril pressionados levemente na superfície do ágar para uniformizar o contato.

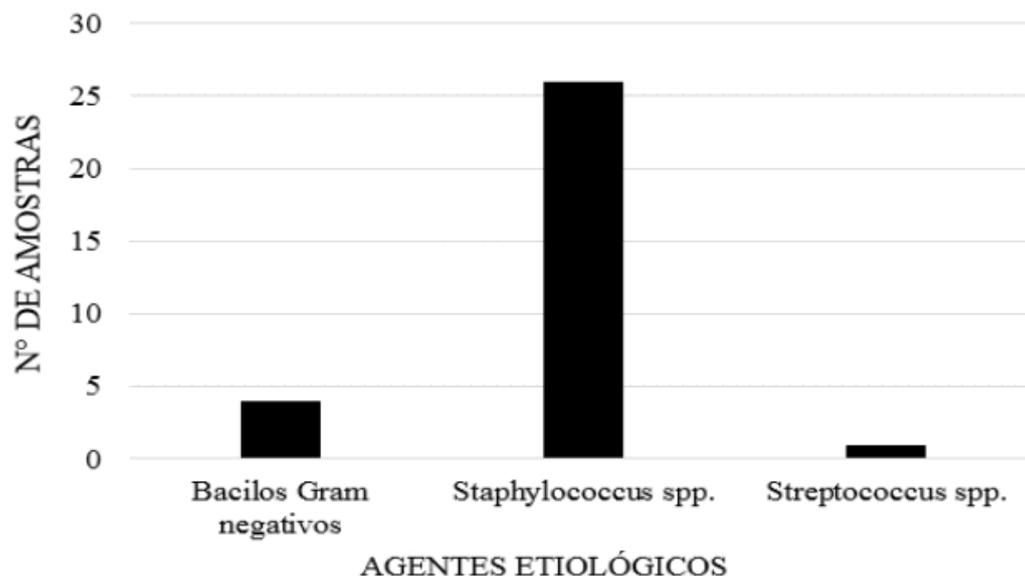
As placas de Petri foram incubadas invertidas a 35°C por 18-24-36 horas, para o desenvolvimento da colônia. Por fim, realizaram-se três leituras de acordo com o diâmetro do halo de inibição, que foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua na parte de trás da placa de Petri invertida, com base nas medidas estabelecidas pela NCCLS (2012b) e classificados como sensíveis, intermediários ou resistentes aos agentes antimicrobianos testados.

Os dados obtidos foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva de frequência absoluta e relativa para os achados microbiológicos e de acordo com a metodologia descrita por Krumperman (1983), calculou-se o índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (MAR) que é obtido pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra foi resistente e o número total de antimicrobianos testados.

Foram obtidas 32,69% (51) amostras positivas para o teste do CMT, entre os tetos analisados nos rebanhos. Na relação entre o exame microbiológico e o teste do CMT, verificou-se que das 51 amostras que apresentaram mastite subclínica, reagentes ao CMT, 60,78% (31) foram positivas ao exame microbiológico. De acordo com Costa *et al.* (1996), o CMT é um método auxiliar ao exame microbiológico, todavia resultados positivos ao CMT e negativos ao exame microbiológico pode ser indicio de um processo inflamatório de origem não bacteriana.

Entre as amostras positivas ao exame microbiológico, observou-se 83,87 % (26) de isolados identificados como *Staphylococcus spp.* (GRÁFICO 01).

Gráfico 1 - Frequência de agentes etiológicos identificados em amostras de leite proveniente de vacas com mastite subclínica em propriedades rurais da região de Bocaiúva - MG.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2016.

Nas três leituras realizadas 18-24-36 horas, de acordo com o NCCLS (2012b), não houve diferença entre os diâmetros dos halos de inibição.

Quanto à sensibilidade dos isolados

identificados com *Staphylococcus* spp, maiores índices de resistência foram observados para a Penicilina G (73,08%) e maiores índices de sensibilidade foram observados para gentamicina com 96,15% (TABELA 1).

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de amostras de leite de vacas com mastite subclínica provenientes de propriedades rurais da região de Bocaiúva - MG.

DISCOS ANTIMICROBIANOS	CLASSIFICAÇÃO		
	SENSÍVEL	INTERMEDIÁRIO	RESISTENTE
Amicacina (30µg)	92,31%	0,00%	7,69%
Cefalexina (30µg)	92,31%	0,00%	7,69%
Eritromicina (15µg)	69,23%	7,69%	23,08%
Estreptomicina (10 µg)	34,62%	57,69%	7,69%
Gentamicina (10 µg)	96,15%	0,00%	3,85%
Norfloxacina (10µg)	88,46%	0,00%	11,54%
Penicilina G (10 UI)	26,92%	0,00%	73,08%
Rifampicina (5 µg)	76,92%	3,85%	19,23%
Sulfonamida (300 µg)	76,92%	3,85%	19,23%
Tetraciclina (30µg)	84,62%	0,00%	15,38%
Trimetoprim (5 µg)	73,08%	7,69%	19,23%
Vancomicina (30 µg)	84,62%	0,00%	15,38%

Fonte: Elaborada pelos autores, 2016.

Das amostras detectadas como bacilos gram negativos classificadas como sensíveis, 100% foram sensíveis à gentamicina, norfloxacina e tetraciclina e 25% a eritromicina. Das classificadas como intermediárias, 100% foram sensíveis à amicacina e cefalexina, 25% ao trimetoprim, 50% a eritromicina e rifampicina e 75% estreptomicina e vancomicina; e das classificadas como resistentes, 100% das amostras testadas foram resistentes a sulfonamida e penicilina G, 75% ao trimetoprim, 50% a rifampicina e 25% à eritromicina, estreptomicina e vancomicina. A amostra positiva para *Streptococcus spp.* apresentou 100% de sensibilidade a todos os 12 antimicrobianos testados.

Dentre os antimicrobianos testados a gentamicina apresentou 96,15% de sensibilidade *in vitro*, seguido da amicacina e cefalexina que apresentaram sensibilidade de 92,31%. A literatura menciona trabalhos que comprovam a eficácia da gentamicina como um antimicrobiano no tratamento de mastite estafilocócica. Em um estudo realizado por Medeiros *et al.* (2009) na Região Metropolitana do Recife do estado de Pernambuco, de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica a gentamicina apresentou sensibilidade de 96,8%. Guimarães *et al.* (2012) estudaram a resistência, de isolados de *Staphylococcus spp.*, aos antimicrobianos, frente a casos de mastite em bovinos e bubalinos, do Distrito Federal e cidades do entorno, e obteve resultados de sensibilidade para a gentamicina de 93,3% em bovinos e 100%, para bubalinos. Oliveira *et al.* (2012) verificaram que dentre os antimicrobianos testados em seu estudo em propriedades leiteiras da microrregião Ilhéus-Itabuna, a gentamicina foi a que teve menor resistência à todos os agentes etiológicos isolados com sensibilidade de 93,3%.

Todavia, em outras regiões onde a gentamicina está sendo utilizada com grande frequência para tratar animais com mastite tem-se apresentado resistente. Freitas *et al.* (2005) em um estudo realizado em fazendas no Agreste do Estado de Pernambuco verificaram resistência em torno de 97% de isolados *Staphylococcus Coagulase Positivos* de leite de vacas com mastite em um dos municípios em que era mais utilizado esse antimicrobiano.

Níveis intermediários de resistência foram obtidos para rifampicina (3,85%), sulfonamida (3,85%), eritromicina (7,69%), trimetoprim (7,69%) e estreptomicina (57,69%). Resultados

similares foram descritos por Silva *et al.* (2012) que na análise de amostras de *Staphylococcus aureus* em rebanhos leiteiros do município de Garanhuns, PE, 2011 obtiveram resultados intermediários de 5% para a eritromicina. Lopes, Lacerda e Ronda (2013) também relatam resistência intermediária ao trimetoprim com resultados inferiores a 5% de isolados de 291 *Staphylococcus spp.* de leite de vacas com mastite subclínica da Região Metropolitana do Recife.

O antimicrobiano que apresentou maior resistência foi a Penicilina G com resistência de 73,08%. Zafalon *et al.* (2008) afirmaram que as penicilinas por serem um dos antimicrobianos mais usados no tratamento da mastite subclínica na Medicina Veterinária pode favorecer o desenvolvimento de resistência dessas bases frente aos agentes etiológicos, no estudo obtiveram resistência média a penicilina de 79,3%, de isolados de *Staphylococcus aureus*, em leite, óstios e insufladores. Freitas *et al.* (2005) obtiveram resistência da penicilina de 80% na análise geral do teste de sensibilidade aos antimicrobianos de 59 cepas classificadas como estafilococos coagulase positivas. Silva *et al.* (2012) em infecções intramamária bovinas recentes obtiveram resultados de resistência a penicilina em infecções recentes de 91% e 100% em infecções crônicas. Os resultados obtidos com esse estudo, analisado junto aos desses investigadores pode ser um indício que as taxas de resistência a penicilina G na região de Bocaiúva - MG encontram-se em crescimento.

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (MAR), obtido pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra foi resistente e o número total de antimicrobianos testados, caracteriza como multirresistentes as amostras que apresentarem valores iguais ou superiores a 0,2 (KRUNPERMAN, 1983).

A amostra de *Streptococcus spp.* não apresentou resistência múltipla aos antimicrobianos, pois apresentou o MAR = 0. Dentre as quatro amostras dos Bacilos gram negativos o MAR variou entre 0,16 e 0,58 com média de 0,37, na qual três (75%), apresentaram-se multirresistentes. Das 26 amostras de *Staphylococcus spp.*, foram observadas variações entre 0 e 1, com a média de 0,5, sendo sete delas (26,92%), com MAR \geq 0,2.

Isso demonstra a importância da realização de teste de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, visto que o uso frequente e indiscrimina-

do de antimicrobianos pode acarretar em resistência bacteriana.

Sugere-se assim um maior controle em relação à mastite subclínica, através da identificação dos agentes etiológicos e realização do teste de sensibilidade *in vitro* frente aos principais antimicrobianos presentes no mercado, para que seja feito um tratamento mais adequado para cada agente, reduzindo o custo de produção do produtor rural e aumentando a qualidade do leite para indústria e para o consumidor final.

Conclusão

A gentamicina, seguida da amicacina e cefalexina, foram os antimicrobianos que apresentaram maiores índices de atividade antimicrobiana frente as bactérias isoladas de leite de vacas com mastite subclínica na de Bocaiúva - MG.

A Penicilina G foi a base antimicrobiana

que apresentou maior índice de resistência frente as bactérias isoladas de leite de vacas com mastite subclínica na região de Bocaiúva - MG.

Observou-se que as bactérias isoladas de leite de vacas com mastite subclínica na região de Bocaiúva - MG, apresentaram índices preocupantes de múltipla resistência aos antimicrobianos

Agradecimentos

Ao Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, por meio do Programa de Apoio a Agricultores Familiares do Norte de Minas – PROAF-UFMG, pela parceira que possibilitou a realização deste trabalho.

Comitê de Ética

Este estudo foi realizado mediante aprovação pelo Comitê de Ética no Uso Animal - CEUA, da Universidade Federal de Minas Gerais, Protocolo nº 145 / 2013.

Referências

- BANDOCH, P.; MELO, L. D. S. D. Prevalência de mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: uma revisão bibliográfica. Publicatio UEPG: biological and Health Sciences, Ponta Grossa, v. 17, n. 1, p. 47-51, 2011.
- BARLOW, J. Mastitis therapy and antimicrobial susceptibility: a multispecies review with a focus on antibiotic treatment of mastitis in dairy cattle. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, n. 4, p. 383-407, 2011.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- COSTA, A. C. D. Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Goiânia, 2010. Disponível em https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/Dissertacao2010_Anna_Carolina.pdf. Acesso em: 01 jul. 2016.
- COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- FREITAS M. F. L., et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 171-177, 2005.
- GUIMARÃES, G. et al. Caracterização fenotípica, produção de biofilme e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite em bovinos e bubalinos. **Revista Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 32, n. 12, p.1219-1224, dez. 2012.
- KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 1165-70, 1983.
- LANGONI, H. et al. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Veterinária e Zootecnia (UNESP)**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 708-715, 2009.
- LOPES, L. O.; LACERDA, M. S. D.; RONDA, J. B. Uso de antibióticos na cura e controle de mastite clínica e subclínica causada por principais microrganismos contagiosos em bovinos leiteiros: revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 11, n. 21, 2013.
- LOPES, L. O.; LACERDA, M. S. D.; RONDA, J. B. Controle e profilaxia de mastite causada por *Staphylococcus* sp. Em vacas leiteiras: Revisão de literatura. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 12, n. 22, 2014.
- MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, jul. 2009.

MENDES, D. (Org.). **Características da região Norte de Minas Gerais**. 2011. Disponível em: <<http://www.favag.edu.br/index.php/institucional/caracteristicas-da-regiao>>. Acesso em: 22 abr. 2015.

NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**: Approved Standard Eleventh Edition. Wayne: CLSI, Jan. 2012a.

NCCLS -National Committee for Clinical Laboratory Standards-. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**: Performance Twenty-Second Informational Supplement. Wayne: CLSI, Jan. 2012b.

OLIVEIRA, U. V. D. *et al.* Eficácia in vitro da gentamicina sobre bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica na microrregião Ilhéus-Itabuna, Bahia. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, Rio de Janeiro, v. 34, n. 3, p.213-218, jul. 2012.

QUINN, P. J. *et al.* Agentes microbianos e produção de doença: causas bacterianas de mastite bovina. In: QUINN, P. J. *et al.* *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **Journal of America Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 130, n. 5, 1957.

SHI, D. *et al.* Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 4, 2010.

SILVA, E. R. D. *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica bovina. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v. 13, n. 3, jul. 2012.

SIMÕES, T. V. M. D. *et al.* **Identificação laboratorial de *Staphylococcus aureus* em leite bovino**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013.

ZAFALON L. F. *et al.* Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 67, n. 2, 2008.