

## SENSIBILIDADE DE BACTÉRIAS CAUSADORAS DE MASTITE BOVINA A EXTRATOS DE PLANTAS NATIVAS DO CERRADO

Ângela Vitalina Barbosa de Assis Silveira<sup>1</sup>

Felipe Alves Bueno<sup>1</sup>

Lucas Zaiden<sup>2</sup>

Gisele Fonseca Ventura<sup>2</sup>

Cleusely Matias de Souza<sup>3</sup>

Ariel Eurides Stella<sup>4</sup>

### RESUMO

A mastite bovina é a doença mais onerosa da produção leiteira e é caracterizada pela inflamação da glândula mamária. O tratamento da doença, sem o controle adequado, gera microrganismos resistentes. Desta forma o uso de fitoterápicos tem se tornado uma fonte de pesquisa como possível alternativa, como as plantas nativas do cerrado Dedaleiro (*Lafoensia pacari*), Jatobá (*Hymenaea* sp.) e Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). No presente trabalho, bactérias isoladas de vacas com mastite subclínica foram identificadas por testes bioquímicos. Posteriormente foram feitos testes de antibiograma e pesquisa por genes de resistência a antibióticos, por fim foi realizado o teste para avaliação da sensibilidade aos extratos das plantas do cerrado. Foram identificados *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterobacter* sp. e *Escherichia coli* (*E. coli*). Entre os isolados de *S. aureus*, foram encontrados resistentes a meticilina (MARS), bem como resistentes à vancomicina (VARs). Foram encontrados isolados produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) para *Enterobacter* sp. e *E. coli*. Os extratos, principalmente de *Stryphnodendron adstringens* e *Lafoensia pacari*, são uma alternativa para a terapêutica antimicrobiana.

**Palavras-chave:** fitoterápicos, resistência antimicrobiana, terapêutica veterinária

### SENSITIVITY OF BACTERIA CAUSING BOVINE MASTITIS TO EXTRACTS OF NATIVE PLANTS OF THE CERRADO

#### ABSTRACT

Bovine mastitis is the most costly disease of dairy production and is characterized by inflammation of the mammary gland. The treatment of the disease, without adequate control, generates resistant microorganisms. In this way, the use of herbal medicines has become a source of research as a possible alternative, such as the native plants of the cerrado Dedaleiro (*Lafoensia pacari*), Jatobá (*Hymenaea* sp.) and Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). In the present work, bacteria isolated from cows with subclinical mastitis were identified through biochemical tests. Subsequently, antibiogram tests and research for antibiotic resistance genes were carried out, finally the test was carried out to evaluate the sensitivity to extracts of cerrado plants. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterobacter* sp. and *Escherichia coli* (*E. coli*). Among the *S. aureus* isolates, methicillin resistant (MARS) as well as vancomycin resistant (VARs) were found. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) producing isolates were found for *Enterobacter* sp. and *E. coli*. The extracts, mainly from

<sup>1</sup> Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Jataí, Goiás. angelasilveira2@discente.ufj.edu.br

<sup>2</sup> PPG em Biociência Animal da Universidade Federal de Jataí, Goiás. lzaiden@discente.ufj.edu.br

<sup>3</sup> Unidade de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Jataí, Goiás. cleusely.souza@ufj.edu.br

<sup>4</sup> Docente da Universidade Federal de Jataí – UFJ. Goiás. ariel.vet@gmail.com

*Stryphnodendron adstringens* and *Lafoensia pacari*, are an alternative for antimicrobial therapy.

**Keywords:** herbal medicines, antimicrobial resistance, veterinary therapy

## SENSIBILIDAD DE BACTERIAS CAUSANTES DE MASTITIS BOVINA A EXTRACTOS DE PLANTAS NATIVAS EN CERRADO

### RESUMEN

La mastitis bovina es la enfermedad más costosa de la producción lechera y se caracteriza por la inflamación de la glándula mamaria. El tratamiento de la enfermedad, sin un control adecuado, genera microorganismos resistentes. De esta forma, el uso de fitoterápicos se ha convertido en fuente de investigación como posible alternativa, como las plantas nativas del cerrado Dedaleiro (*Lafoensia pacari*), Jatobá (*Hymenaea* sp.) y Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). En el presente trabajo se identificaron mediante pruebas bioquímicas bacterias aisladas de vacas con mastitis subclínica. Posteriormente se realizaron pruebas de antibiograma e investigación de genes de resistencia a antibióticos, finalmente se realizó la prueba para evaluar la sensibilidad a extractos de plantas de cerrado. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterobacter* sp. y *Escherichia coli* (*E. coli*). Entre los aislamientos de *S. aureus*, se encontraron resistentes a la meticilina (MARS) y resistentes a la vancomicina (VARs). Se encontraron aislamientos productores de betalactamasas de espectro extendido (ESBL) para *Enterobacter* sp. y *E. coli*. Los extractos, principalmente de *Stryphnodendron adstringens* y *Lafoensia pacari*, son una alternativa para la terapia antimicrobiana.

**Palabras clave:** medicamentos a base de hierbas, resistencia a los antimicrobianos, terapia veterinaria

### INTRODUÇÃO

A mastite bovina é a doença mais onerosa da bovinocultura leiteira e é caracterizada pela inflamação da glândula mamária, que pode ocorrer devido fatores traumáticos, químicos ou a uma infecção. Tem grande importância visto que o leite do animal acometido e em tratamento é descartado. Além disso a mastite promove a redução da qualidade do leite e a diminuição da produção. Desta forma, a mastite é um grande desafio para a saúde pública, para a indústria e para o produtor. Os microrganismos mais prevalentes na mastite bovina são *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (1). Os microrganismos causadores de mastite contagiosa vivem no hospedeiro, e geralmente promovem infecções subclínicas. Já os microrganismos causadores de mastite ambiental são oportunistas, e vivem no ambiente, promovendo principalmente infecções clínicas (1, 2).

O tratamento da mastite sem o uso adequado de antibióticos tem gerado grupos de microrganismos resistentes. A presença desses microrganismos na pecuária se estabelece como um problema de saúde pública, uma vez, que esses microrganismos podem chegar aos consumidores através de produtos contaminados. Além disso promove dificuldades dentro do processo produtivo, porque as opções de tratamento ficam limitadas (3). As  $\beta$ -lactamasas de espectro estendido (ESBL) estão entre os principais mecanismos de resistência das bactérias Gram-negativas, em que microrganismos são capazes de inativar cefalosporinas, penicilinas e aztreonam. O gene responsável pela resistência está, geralmente, contido em um plasmídeo e os grupos de ESBL que apresentam maior capacidade de interação e transmissão, são CTX-M,

SHV e TEM. A detecção de bactérias Gram-negativas ESBL no leite, especialmente cru e derivados, demonstraram que o alimento pode promover o carreamento das ESBL à alimentação humana, ocasionando infecções de difícil tratamento por indisponibilidade de princípios ativos eficientes (4,5). Dentre as bactérias Gram-positivas, as principais linhagens resistentes são *S. aureus* resistentes a meticiclina (MRSA) e os *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA). Os MRSA caracterizam-se por apresentarem resistência a  $\beta$ -lactâmicos e oxacilinas. A presença do gene *mecA* e sua variação, *mecC*, é responsável pela codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP2a), uma proteína funcional, entretanto que não tem afinidade pelos antibióticos. A atividade agropecuária é um dos fatores responsáveis pela contaminação por MRSA em humanos, provavelmente devido ao excesso de uso de antibióticos e ao incorreto descarte e manejo dos resíduos nos diversos setores produtores de alimentos de origem animal (6,7).

Os antibióticos convencionais nem sempre se mostram eficientes no combate a mastite, além de promoverem grande impacto econômico e epidemiológico, visto que existe o risco de resíduo no leite. Desta forma o uso de fitoterápicos tem se tornado uma possível alternativa, e a aplicação na mastite pode promover benefícios terapêuticos e econômicos. *Lafoensia pacari* (Dedaleiro), *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) e *Hymenaea sp.* (Jatobá) são plantas do cerrado, e alguns estudos indicam possíveis atividades antimicrobianas (8,9,10).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de bactérias causadoras de mastite frente aos extratos de *Lafoensia*, *Stryphnodendron adstringens* e *Hymenaea sp.* Também foi investigada a presença de genes de resistência e o seu respectivo fenótipo nos isolados.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os isolados utilizados foram identificados no leite de vacas com mastite subclínica e pertencem ao acervo da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Jataí. Foram identificadas a partir de testes bioquímicos. Além da coloração de Gram, foram realizados os testes de TSI, indol, motilidade, ornitina, VMVP, citrato, urease, lisina e fenilalanina para as bactérias Gram-negativas, enquanto que para as bactérias Gram-positivas foram realizados os testes de catalase, sensibilidade a bacitracina, coagulase, DNase, sensibilidade a novobiocina, manose, manitol e polimixina.

Para a realização das PCRs foi feita a extração de DNA, por lise térmica, que foi preservado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Após a extração foram identificados os genes de resistência *mecA* e *mecC*. A detecção do gene *mecA* foi realizada utilizando-se os *primers* 5'-AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3' e 5' AGT TCT GCA GTA CCG AT TTG C 3 (6). Já a detecção do gene *mecC* foi feita utilizando os *primers* 5'-TGTTGTAGCAATGTTACACAC-3' e 5'-CAAGCACTTAATATCAACGC- 3' (11). Todos os produtos após o processo de amplificação foram analisados em gel de agarose.

A PCR também foi realizada para os isolados Gram-negativos, foram investigados os grupos SHV, TEM e cinco subgrupos de CTX-M. Os *primers* utilizados para o gene SHV foram, 5' AGG ATT GAC TGC CTT TTT G e 5' ATT TGC TGA TTT CGC TCG (392 pb), e para o gene TEM foram, 5' TTG GGT GCA CGA GTG GGT TA e 5' TAA TTG TTG CCG GGA AGC TA (465 pb). Para as cinco classes de CTX-M, os iniciadores foram: classe 1, 5' AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC e 5' AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT (415 pb); classe 2, 5' CGA CGC TAC CCC TGC TAT T e 5' CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG (552 pb); classe 9, 5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG e 5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC (205 pb); classe 18 TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC e 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C (666 pb), e classe 25, 5' GCA CGA TGA CAT TCG GG e 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C (327 pb). Como controle positivo, foram utilizadas cepas pertencentes à

bacterioteca do laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Jataí. As reações de PCR foram montadas com um volume final de 25 µl, sendo 12,5 µl de Promega Mix 0,5 µl de cada primer; 5 µl de água ultrapura e 2,5 µl de DNA (12,13).

Foi realizado antibiograma pelo método de disco difusão em ágar Muller-Hinton com uso de clindamicina (2µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), cefoxitina (30µg) e vancomicina (30µg) para as bactérias Gram-positivas. Para as Gram-negativas foram utilizados cefoxitina (30µg), cefalotina (10µg), cefotaxima (30µg), amoxiciclina com clavulanato (30µg), ampicilina (10µg), piperaciclina com tazobactan (100+10µg), imipenem (10µg) e cefepime (30µg).

O material botânico das plantas nativas do cerrado [*Lafoensia pacari* A.St.-Hil. (Dedaleiro); *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão); *Hymenaea courbaril* L. (Jatobá)] foram obtidos no município de Jataí, na região sudoeste do estado de Goiás (GO) Latitude: -17.8759, Longitude: -51.7214 17° 52' 33" Sul, 51° 43' 17" Oeste.

Foram utilizados galhos contendo folhas verdes, livres de patógenos, sendo a identificação botânica realizada pelo Herbário Jataiense (HJ) do Departamento de Biologia Botânica da Universidade Federal de Jataí-UFJ. Os extratos foram fabricados das folhas do jatobá e do dedaleiro, e da casca do barbatimão. Primeiramente o material foi submetido a secagem em temperatura ambiente, por 24 horas, logo em seguida foi acondicionado em sacos de papel em estufa de secagem a 55°C por 3 dias. Posteriormente o material foi moído e guardado em frascos ao abrigo de luz e umidade. O material moído foi então adicionado ao álcool absoluto em proporções iguais (g/g), foi deixado por 24 horas e feito posteriormente a lavagem por 3 vezes. Após foi colocado em banho maria a 55 °C e mantido até a evaporação completa do álcool. Em seguida, foi adicionado água destilada autoclavada, também na mesma proporção (g/g), e o extrato foi conservado a -20°C (14).

Os extratos foram testados em concentrações decrescentes para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM): 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%. As culturas bacterianas isoladas foram cultivadas em meio BHI (Brain heart infusion), e ressuspensas em solução salina 0,85% até a turvação três na escala de Mc Farland (9x10<sup>8</sup> UFC/ml). Foram realizados três testes independentes (triplicata), utilizando-se a metodologia de microdiluição seriada em microtubos (contendo o meio de culturas + bactérias + extratos), cultivados por 24h a 37°C. Os controles foram, positivo (meio de cultivo + microrganismo) e negativo (meio de cultivo + extratos). A CBM dos extratos foi definida por meio da quantificação de células bacterianas (UFC/mL) viáveis em cada concentração testada (14).

## RESULTADOS

Os isolados utilizados foram identificados como, *S. aureus* (11), *Enterobacter* sp. (2) e *E. coli* (6). Das bactérias Gram-negativas submetidas a PCR para a identificação dos genes de resistência *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, apenas uma apresentou o gene *TEM* e uma apresentou o gene *CTX-M*, mas nenhuma apresentou o gene *SHV*. *S. aureus* foram submetidos a PCR para identificação do gene *mecA* e *mecC*, contudo não foi identificada a presença do gene em nenhuma isolado, entretanto foram observadas resistências a clindamicina, cefoxitina(MRSA), vancomicina(VRSA) e ciprofloxacina. Não foram observadas resistências a gentamicina (Tabela 1).

Os isolados Gram-negativos apresentaram resistência a cefoxitina, cefotaxima, cefalotina, amoxiciclina + clavulanato, imipenem e cefepime. Verificou-se a presença de resistência a β-lactamicos (isolados 15 e 19) associados a presença de genes de resistência (Tabela 2). A CBM dos extratos está descrita na de, onde podemos observar que *Stryphnodendron adstringens* e *Lafoensia pacari* demonstraram maior eficiência

antimicrobiana frente aos microrganismos causadores de mastite. As bactérias apresentaram sensibilidades em diferentes concentrações dos extratos.

Tabela 1. Perfil fenotípico de resistência antimicrobiana, de *S. aureus* isolados de vacas com mastite.

| Isolado | Espécie          | GEN | CIP | VAN | CFO | CLI |
|---------|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | S   | S   | S   |
| 2       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | R   | S   | S   |
| 3       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | S   | S   | S   |
| 4       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | R   | S   | S   |
| 5       | <i>S. aureus</i> | S   | I   | R   | R   | R   |
| 6       | <i>S. aureus</i> | S   | I   | S   | R   | R   |
| 7       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | R   | S   | S   |
| 8       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | R   | S   | S   |
| 9       | <i>S. aureus</i> | S   | S   | S   | S   | S   |
| 10      | <i>S. aureus</i> | S   | I   | S   | R   | R   |
| 11      | <i>S. aureus</i> | I   | R   | R   | R   | R   |

S: Sensível; R: Resistente; I: Intermediário; Gen: Gentamicina 10 mg; Ciprofloxacina 5mg; VAN: Vancomicina 30mg; CFO: Cefoxitina 30mg; CLI: Clindamicina 2mg

Tabela 2. Perfil fenotípico e genotípico de resistência, de bactérias Gram negativas oriundas de vacas com mastite.

| Isolado | Espécie             | Gene TEM | Gene SHV | Gene CTX-M | PPT | AMP | AMC | CFO | CTX | CFL | IPM | FEP |
|---------|---------------------|----------|----------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 12      | <i>E. coli</i>      |          |          |            | S   | S   | S   | S   | S   | R   | I   | S   |
| 13      | <i>E. coli</i>      |          |          |            | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   |
| 14      | <i>E. coli</i>      |          |          |            | S   | I   | S   | S   | S   | R   | S   | S   |
| 15      | <i>E. coli</i>      |          |          | X          | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   |
| 16      | <i>E. coli</i>      |          |          |            | S   | S   | S   | S   | S   | R   | I   | S   |
| 17      | <i>E. coli</i>      |          |          |            | S   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   |
| 18      | <i>Enterobacter</i> |          |          |            | S   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | I   |
| 19      | <i>Enterobacter</i> | X        |          |            | S   | R   | R   | R   | R   | R   | I   | I   |

S: Sensível; R: Resistente; I: Intermediário; PPT: piperacilina + tazobactam; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxiciclina + Clavulanato; CFO: Cefoxitina; CTX: Cefotaxima; CFL: Cefalotina; IPM: Imipenem; CEF: Cefepime.

Tabela 3. Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os isolados, frente aos extratos de Dedaleiro (*Lafoensia pacari*), Jatobá (*Hymenaea courbaril*) e Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*).

| Microrganismos |                         | Plantas                                |    |      |      |      |      |                               |    |      |      |      |                             |    |    |      |      |      |      |
|----------------|-------------------------|--|----|------|------|------|------|-------------------------------|----|------|------|------|-----------------------------|----|----|------|------|------|------|
|                |                         | <i>Stryphnodendron adstringens</i> (%) |    |      |      |      |      | <i>Hymenaea courbaril</i> (%) |    |      |      |      | <i>Lafoensia pacari</i> (%) |    |    |      |      |      |      |
| Isolado        | Espécie                 | 50                                     | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 50                            | 25 | 12,5 | 6.25 | 3.12 | 1.56                        | 50 | 25 | 12,5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 |
| 1              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ○                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 2              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ○  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 3              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ○                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 4              | <i>S. aureus</i>        | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ○  | ○    | ●    | ●    | ●    |
| 5              | <i>S. aureus</i>        | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ●  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 6              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 7              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ○  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 8              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ○  | ○    | ●    | ●    | ●    | ○                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 9              | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ○                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 10             | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ○  | ○    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ●  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 11             | <i>S. aureus</i>        | ○                                      | ○  | ○    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ○  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 12             | <i>E. coli</i>          | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ○  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 13             | <i>E. coli</i>          | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 14             | <i>E. coli</i>          | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 15             | <i>E. coli</i>          | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 16             | <i>E. coli</i>          | ○                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 17             | <i>E. coli</i>          | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 18             | <i>Enterobacter sp.</i> | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ●  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |
| 19             | <i>Enterobacter sp.</i> | ●                                      | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    | ●                             | ●  | ●    | ●    | ●    | ●                           | ○  | ●  | ●    | ●    | ●    | ●    |

● Presença de colônias no agar PCA; ○ Ausência de colônias no agar PCA;

## DISCUSSÃO

Analisando os isolados de *S. aureus* observou-se resistência a clindamicina, cefoxitina, ciprofloxacina e vancomicina, não se tendo observado resistência a gentamicina, sendo que 55% apresentaram multiresistência. Os resultados foram diferentes dos encontrados por outro estudo em Goiás, onde o perfil de resistência a estes antibióticos variou bastante, demonstrando alta resistência a gentamicina, entretanto com menos isolados multiresistentes (15). Apesar de não portarem os genes *mecA* e *mecC*, alguns isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a cefoxitina caracterizando-se fenotipicamente como MRSA, e resistência à vancomicina caracterizando-se como VRSA. Vários trabalhos demonstram que a frequência de isolados MRSA/VRSA pode variar em casos de mastite (16,17,18,19,20). Entretanto, um estudo sugere que o MRSA não se dissemina no Brasil em rebanhos leiteiros (21).

A disseminação da resistência antimicrobiana, em bactérias de origem animal, representa uma séria ameaça à saúde humana. Portanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) indica medidas de vigilância de padrões de resistência para permitir a detecção precoce de novas cepas (22). *E. coli* e *Enterobacter sp.* foram resistentes a cefoxitina, cefotaxime, cefalotina, amoxicilina/clavulanato, imipenem e cefepime. E apesar de não se observar resistência a piperacilina/tazobactam, alguns isolados eram multiresistentes. O isolado 15, uma *E. coli* portadora do gene *CTX-M*, apresentou fenótipo de resistência a

cefalotina e foi a única a apresentar resistência ao imipenem. Este antimicrobiano é altamente resistente as beta-lactamases, sendo uma importante opção terapêutica. Entretanto, a posse do gene *CTX-M* pela cepa, provavelmente bloqueou a ação do antimicrobiano, e alerta para a disseminação de cepas ESBL, como essa entre o rebanho bovino leiteiro. Já o isolado 19, um *Enterobacter* sp. portador do gene *TEM*, foi resistente a vários beta-lactâmicos e cefalosporinas.

A circulação de cepas de enterobactérias causadoras de mastite bovina, produtoras de beta-lactamases portando estes genes, já foi descrita na Grécia (23), França (24), China (25), Japão (26), dentre outros. A transferência horizontal de genes que codificam  $\beta$ -lactamases é um mecanismo comum de disseminação de resistência, além disso, cepas produtoras de ESBL têm maior propensão a expressar resistência a múltiplas drogas do que cepas não produtoras (27), algo observado no isolado 19. A grande maioria das ESBL pertencem a 3 tipos, incluindo TEM, CTX-M e SHV (28), dois destes observados nos isolados pesquisados. Esses resultados, destacam o valor da busca ativa da resistência antimicrobiana, não comumente testada por laboratórios de diagnóstico, para a detecção de novas cepas resistentes.

A resistência a vancomicina e imipenem observada em *S. aureus* e *E. coli*, neste trabalho, é de forma geral bastante preocupante, haja visto que são antimicrobianos reservados para uso em humanos (29). Além disso, para preservar a eficácia das cefalosporinas de espectro estendido para o tratamento de mastites graves é essencial que a cultura/antibiograma seja realizada, evitando, portanto, a terapia empírica (30).

Seguramente, a emergência da resistência antimicrobiana entre cepas circulantes entre animais de produção, passa pelo aumento da pressão seletiva sobre estes microrganismos, por meio do uso abusivo dos antibióticos na agropecuária. Para resolvermos este problema, simplesmente a restrição de uso não nos trará efeitos a curto e médio prazo, também é necessário encontrarmos substâncias terapêuticas e profiláticas alternativas. Visto que não somente temos como alvo o controle da doença, mas também a manutenção de uma bovinocultura leiteira baseada no bem-estar animal. Neste sentido o desenvolvimento de fitoterápicos é uma opção potencialmente sustentável.

Portanto, é necessário desenvolver alternativas naturais e métodos seguros para o controle destas infecções. As plantas medicinais são bem conhecidas por terem atividade antibacteriana contra diversos agentes patogênicos, e tratamentos alternativos para mastite bovina já foram realizados com compostos de plantas dando resultados interessantes (31), além disso estes compostos são considerados mais seguros ambientalmente (32). Neste sentido, estudos são necessários para descobrir o possível potencial, para o controle da mastite bovina, de várias espécies de plantas de áreas ricas em biodiversidade ao redor do mundo (33).

Neste trabalho foi observado que a sensibilidade dos isolados variou bastante, entretanto podemos observar concentração inibitória em 12.5%, 25% e 50% tanto para o extrato de *Lafoensia pacari* como para o extrato de *Stryphnodendron adstringens*, principalmente para os isolados de *S. aureus*, inclusive para algumas cepas MRSA. Já para o extrato de *Hymenaea courbaril* foi observada pouca sensibilidade dos isolados, e apenas para a maior concentração, a de 50%.

Estudos mostram que existe uma variação de sensibilidade, tanto quanto para as plantas, bem como para as espécies bacterianas testadas (10,34,35). Relata-se também, que fitoterápicos podem potencialmente inibir a formação de biofilmes (36) e bombas de efluxo(37), importantes fatores de virulência de microrganismos causadores de mastite. Além disso, óleos essenciais, oriundos de plantas, também já se mostraram eficientes frente a cepas de *S. aureus* causadores de mastite (38). Ribeiro et al. (39) destacam, como neste trabalho, que extratos de plantas do cerrado podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de uma bovinocultura sustentável, diminuindo a poluição ambiental pelos resíduos antibióticos, bem como diminuindo a pressão seletiva no ambiente da fazenda.

## CONCLUSÃO

Foram identificados isolados MRSA, VRSA e ESBL, de casos de mastite bovina subclínica. Entretanto, alguns isolados apresentaram sensibilidade para os extratos de *Lafoensia pacari* e *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações de 12.5%, 25% e 50%, portanto estes fitoterápicos podem se tornar uma alternativa para o combate aos microrganismos causadores da mastite, sendo este uso potencialmente relevante no âmbito da produção sustentável de bovinos de leite. Pouca sensibilidade foi observada para o extrato de *Hymenaea courbaril*.

## REFERÊNCIAS

1. Ruegg PL. A 100-year review: mastitis detection, management, and prevention. J Dairy Sci. 2017;100(12):10381-97. doi: [10.3168/jds.2017-13023](https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023).
2. Acosta AC, Silva LBG, Medeiros ES, Pinheiro-Júnior JW, Mota RA. Mastites em ruminantes no Brasil. Pesqui Vet Bras. 2016;36(7):565-73. doi: [10.1590/S0100-736X2016000700001](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000700001).
3. Silva KC, Lincopan N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. J Bras Patol Med Lab. 2012;48(2):91-9. doi: [10.1590/S1676-24442012000200004](https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000200004).
4. Orsi H. Diversidade genética e pesquisa de *Escherichia coli*, produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL), isolada de leite de vacas com mastite clínica [dissertação] [Internet]. Botucatu (SP): Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista; 2020 [citado 5 Jan 2023]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/192305>
5. Rahman SU, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. BioMed Res Int. 2018;9519718. doi: [10.1155/2018/9519718](https://doi.org/10.1155/2018/9519718).
6. Monecke S, Gavier-Widen D, Mattsson R, Rangstrup-Christensen L, Lazaris A, Coleman DC, et al. Detection of mecC-Positive *Staphylococcus aureus* (CC130-MRSA-XI) in Diseased European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in Sweden. PloS ONE. 2013;8(6):e66166. doi: [10.1371/journal.pone.0066166](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066166).
7. Cerqueira ES, Almeida RCC. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) em alimentos de origem animal: uma revisão sistemática. Rev Inst Adolfo Lutz. 2013;72(4):268-81. <https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/32928>
8. Pereira EM, Gomes RT, Freire NR, Aguiar EG, Brandão MGL, Santos VR. In vitro antimicrobial activity of Brazilian medicinal plant extracts against pathogenic microorganisms of interest to dentistry. Planta Med. 2011;77(4):401-4. doi: [10.1055/s-0030-1250354](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250354).



9. Máthé Á, Silva JCS. Introduction to medicinal and aromatic plants in Brazil. In: Albuquerque UP, Patil U, Máthé Á, editors. Medicinal and aromatic plants of South America. Dordrecht: Springer; 2018. p. 47-69. doi: 10.1007/978-94-024-1552-0\_3.
10. Vieira DS, Peixoto RM, Costa MM, Freire DP, Silva TMG, Silva TMS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato etanólico bruto da folha da *Hymenaea martiana* Hayne frente às *Staphylococcus* sp. e avaliação de seu potencial como desinfetante em cabras. *Pesqui Vet Bras.* 2018;38(3):462-9. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-4547.
11. European Union Reference Laboratory-Antibiotic Resistance - EURL-AR. Protocol for PCR amplification of *mecA*, *mecC* (*mecA<sub>LGA251</sub>*), *SPA* and *PVL* recommended by the EURL-AR - 2ST Version [Internet]. Kemitovet: DTU Food; 2012 [citado 5 Jan 2023]. Disponível em: [https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279\\_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf)
12. Bajpai T, Pandey M, Varma M, Bhatambare GS. Prevalence of TEM, SHV, and CTX-M Beta-Lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. *Avicenna J Med.* 2017;7(1):12-6. doi: 10.4103/2231-0770.197508.
13. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(1):154-5. doi: 10.1093/jac/dki412.
14. Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1302-8. doi: 10.1590/S1517-83822012000400009.
15. Almeida TVD. Fatores de risco para mastite bovina e avaliação fenotípica de resistência antimicrobiana [dissertação] [Internet]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2020 [citado 5 Jan 2023]. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/10485>
16. Intrakamhaeng M, Komutarin T, Pimpukdee K, Aengwanich W. Incidence of enterotoxin-producing MRSA in bovine mastite cases, bulk milk thands and processing plants in Thailand. *J Anim Vet Adv.* 2012;11(5):655-61. doi: 10.3923/javaa.2012.655.661.
17. Pu WX, Su Y, Li JX, Li CH, Yang ZQ, Deng HP, et al. High incidence of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* (OS-MRSA) associated with bovine mastitis in China. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e88134. doi: 10.1371/journal.pone.0088134.
18. Mendonça AT, Carvalho GA, Inácio MCP, Pereira MA. Avaliação antimicrobiana da eficácia dos extratos hidroalcoólicos da pitangueira e da goiabeira, in vitro, contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. *Rev Augustus.* 2021;27(54):59-77. doi: 10.15202/10.15202/1981896.2021v27n54p59.

19. Nader TT, Coppede JS, Taleb-Contini SH, Amaral LA, Pereira AMS. Atividade antibiofilme de substâncias de *Croton urucurana* em *Staphylococcus aureus* isolado de mastite bovina. *Pesqui Vet Bras*. 2018;38(9):1713-9. doi: 10.1590/1678-5150-PVB-5034.
20. Nader Filho A, Ferreira LM, Amaral LA, Rossi OD Jr, Oliveira RP. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arq Inst Biol*. 2007;74(1):1-4. doi: 10.1590/1808-1657v74p0012007.
21. Aizawa J, Souza-Filho AF, Guimarães AS, Vasconcelos CG, Brito MAVP, Sellera FP, et al. Retrospective multicenter study reveals absence of MRSA-associated bovine mastitis in Brazil (1994 to 2016). *J Infect Dev Ctries*. 2019;13(6):581-3. doi: 10.3855/jidc.11406.
22. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [citado 5 Jan 2023]. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/?sequence=1>
23. Filioussis G, Kachrimanidou M, Christodoulouopoulos G, Kyritsi M, Hadjichristodoulou C, Adamopoulou M, et al. Short Communication: bovine mastitis caused by a multidrug-resistant, mcr-1-positive (colistin-resistant), extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* clone on a Greek dairy farm. *J Dairy Sci*. 2020;103(1):852-7. doi: [10.3168/jds.2019-17320](https://doi.org/10.3168/jds.2019-17320).
24. Dahmen S, Métayer V, Gay E, Madec J-Y, Haenni M. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. *Vet Microbiol*. 2013;162(2-4):793-9. doi: [10.1016/j.vetmic.2012.10.015](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.015).
25. Feng Y, Zhang S-D, Shang X-F, Wang X-R, Wang L, Yan Z-T, et al. Prevalence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from bovine mastitis cases in China. *J Integr Agric*. 2018;17(6):1246-51. doi: [10.1016/S2095-3119\(17\)61830-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61830-6).
26. Ohnishi M, Okatani AT, Harada K, Sawada T, Marumo K, Murakami M, et al. Genetic characteristics of CTX-M-type extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae involved in mastitis cases on Japanese dairy farms, 2007 to 2011. *J Clin Microbiol*. 2013;51(9):3117-22. doi: [10.1128/JCM.00920-13](https://doi.org/10.1128/JCM.00920-13).
27. Karkaba A, Grinberg A, Benschop J, Pleydell E. Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and *ampC*  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from companion animals in New Zealand. *N Z Vet J*. 2017;65(2):105-12. doi: 10.1080/00480169.2016.1271730.
28. Li L, Wang B, Feng S, Li J, Wu C, Wang Y, et al. Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes in *Escherichia coli* isolated from chickens in Anhui province, China. *PLoS ONE*. 2014;9(8):e104356. doi: [10.1371/journal.pone.0104356](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104356).

29. Cheng J, Qu W, Barkema HW, Nobrega DB, Gao J, Liu G, et al. Antimicrobial resistance profiles of 5 common bovine mastitis pathogens in large Chinese dairy herds. *J Dairy Sci.* 2019;102(3):2416-26. doi: [10.3168/jds.2018-15135](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15135).
30. Timofte D, Maciuca IE, Evans NJ, Williams H, Wattret A, Fick JC, et al. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12  $\beta$ -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):789-94. doi: [10.1128/AAC.00752-13](https://doi.org/10.1128/AAC.00752-13).
31. Mubarack HM, Doss A, Dhanabalan R, Venkataswamy R. Activity of some selected medicinal plant extracts against bovine mastitis pathogens. *J Anim Vet Adv.* 2011;10(6):738-41. doi: [10.3923/javaa.2011.738.741](https://doi.org/10.3923/javaa.2011.738.741).
32. Lopes TS, Fontoura PS, Oliveira A, Rizzo FA, Silveira S, Streck AF. Use of plant extracts and essential oils in the control of bovine mastitis. *Res Vet Sci.* 2020;131:186-93. doi: [10.1016/j.rvsc.2020.04.025](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.025).
33. Mushtaq S, Shah AM, Shah A, Lone SA, Hussain A, Hassan QP, et al. Bovine mastitis: an appraisal of its alternative herbal cure. *Microb Pathog.* 2018;114:357-61. doi: [10.1016/j.micpath.2017.12.024](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.024).
34. Porfírio Z, Melo-Filho GC, Alvino V, Lima MRF, Sant'Ana AEG. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;19(3):785-9. doi: [10.1590/S0102-695X2009000500023](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500023).
35. Kovačević Z, Radinović M, Čabarkapa I, Kladar N, Božin B. Natural agents against bovine mastitis pathogens. *Antibiotics.* 2021;10(2):205. doi: [10.3390/antibiotics10020205](https://doi.org/10.3390/antibiotics10020205).
36. Chen X, Shang F, Meng Y, Li L, Cui Y, Zhang M, et al. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. *J Dairy Sci.* 2015;98(12):8486-91. doi: [10.3168/jds.2015-9899](https://doi.org/10.3168/jds.2015-9899).
37. Tegos G, Stermitz FR, Lomovskaya O, Lewis K. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(10):3133-41. doi: [10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002](https://doi.org/10.1128/AAC.46.10.3133-3141.2002).
38. Fratini F, Casella S, Leonardi M, Pisseri F, Ebani VV, Pistelli L, et al. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. *Fitoterapia.* 2014;96:1-7. doi: [10.1016/j.fitote.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.04.003).
39. Ribeiro ICO, Mariano EGA, Careli RT, Morais-Costa F, Sant'Anna FM, Pinto MS, et al. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. *BMC Vet Res.* 2018;14(1):32. doi: [10.1186/s12917-018-1351-1](https://doi.org/10.1186/s12917-018-1351-1).

**Recebido em: 26/09/2022**

**Aceito em: 13/01/2023**