

SENSIBILIDADE MICROBIANA DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS DE LEITE DE CABRAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

Anelise Salina¹
Gustavo Puglia Machado¹
Felipe de Freitas Guimarães¹
Helio Langoni²

RESUMO

Um dos entraves à produção de leite caprino é a mastite, processo inflamatório da glândula mamária que determina sérios prejuízos econômicos e representa risco iminente à saúde pública, tendo em vista que micro-organismos causadores de mastites são potencialmente patogênicos para os seres humanos. O uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento dos animais pode desencadear a seleção de micro-organismos multirresistentes, além de produzir resíduos no leite e derivados, intensificando os agravos à saúde pública. Considerando que os estafilococos são comumente isolados a partir de casos de mastite em caprinos, e tendo em vista que o antibiograma possibilita o direcionamento estratégico para o tratamento dos rebanhos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade *in vitro*, frente a dez antimicrobianos de 86 cepas de estafilococos isoladas de amostras de leite de cabras, a partir de casos de mastite subclínica. Verificou-se que o antimicrobiano mais efetivo foi a gentamicina, com 96,5% de sensibilidade; seguido de cefalexina e neomicina, com 95,3% de sensibilidade a cada um destes antimicrobianos. Os antimicrobianos aos quais os micro-organismos apresentaram maior resistência foram: ampicilina (37,2%), penicilina (27,9%) e tetraciclina (24,4%). Os resultados alertam para a importância do diagnóstico precoce das mastites em caprinos, bem como do estudo do perfil de sensibilidade microbiana, para aumentar a possibilidade de êxito do tratamento de mastites, principalmente à secagem evitando a ocorrência de casos crônicos e a seleção de micro-organismos multirresistentes.

Palavras-chave: leite, caprinos, estafilococos, antibiograma, diagnóstico.

MICROBIAL SENSIBILITY OF *Staphylococcus* spp. ISOLATED OF GOAT MILK WITH SUBCLINICAL MASTITIS

ABSTRACT

One of the barriers to the production of goat milk is mastitis, inflammation of the mammary gland that determines serious economic losses and is imminent risk to public health, considering that microorganisms causing of mastitis are potentially pathogenic to humans. The indiscriminate use of antimicrobials in the treatment of animals can trigger the selection of multiresistant microorganisms, and produce residues in milk and dairy products intensifying the harm to public health. Whereas staphylococci are commonly isolated from cases of mastitis in goats, and considering that the antibiogram allows the strategic direction for the treatment of the herds, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profile, front to ten antimicrobials of 86 staphylococci strains isolated from goats milk samples from cases of subclinical mastitis. It was found that the most effective

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar, FMVZ – UNESP/Botucatu - SP

² Professor Titular e Bolsista PQ-1A-CNPq – Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, FMVZ - UNESP/Botucatu – SP. Contato principal para correspondência.

antibiotic was gentamicin with 96.5% sensitivity; cephalexin and neomycin followed with 95.3% sensitivity for each of these antimicrobials. The antimicrobial agents with the microorganisms had more resistance were: ampicillin (37.2%), penicillin (27.9%) and tetracycline (24.4%). The results emphasize the importance of early diagnosis of mastitis in goats as well as the antimicrobial susceptibility profile study to increase chance of successful the treatment of mastitis, avoiding the occurrence of chronic cases and the selection of multiresistant microorganisms.

Keywords: milk, goat, staphylococci, antibiogram, diagnostic.

SENSIBILIDAD MICROBIANA DE AISLADOS DE *Staphylococcus* spp. DE LECHE CAPRINA EN CASOS DE MASTITIS SUBCLÍNICA

RESUMEN

Uno de los obstáculos para la producción de leche de cabra es la mastitis, inflamación de la glándula mamaria que determina serias pérdidas económicas y es un riesgo inminente para la salud pública, dado que los microorganismos causantes de mastitis son potencialmente patógenos para los seres humanos. El uso indiscriminado de antibióticos en el tratamiento de los animales puede provocar la selección de microorganismos multirresistentes, y producir residuos en la leche y sus derivados, mediante la intensificación de amenazas para la salud pública. Mientras que los estafilococos son comúnmente aislados de casos de mastitis en cabras, y considerando que el antibiograma es la dirección estratégica para el tratamiento de los animales, el objetivo de este estudio fue evaluar la sensibilidad in vitro, de 86 cepas de estafilococos frente a diez antimicrobianos, aisladas de muestras de leche de cabra de casos de mastitis subclínica. Se encontró que las cepas aisladas mostraron mayor sensibilidad para el antibiótico gentamicina con 96,5%; cefalexina y neomicina siguieron con 95,3% de sensibilidad respectivamente. En contraste, los aislados presentaron mayor resistencia para los antibióticos ampicilina (37,2%), penicilina (27,9%) y tetraciclina (24,4%). Los resultados ponen de relieve la importancia del diagnóstico precoz de la mastitis en cabras, así como el estudio de perfil de sensibilidad microbiana, para aumentar las posibilidades de éxito en la prevención de la ocurrencia de los casos crónicos y la selección de microorganismos multirresistentes.

Palabras clave: leche, caprino, estafilococos, susceptibilidad a los antibióticos, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira tem representado um segmento importante de mercado no Brasil (1), tendo em vista as características físico-químicas e nutricionais do leite caprino, e a maior seletividade dos consumidores, que buscam cada vez mais por produtos saudáveis e de qualidade comprovada. Por apresentar rápida digestibilidade, é recomendado a pessoas com intolerância à lactose. Ademais, é cientificamente comprovado que o consumo habitual de leite de cabra resulta em efeitos positivos no metabolismo mineral, na recuperação da anemia ferropriva e na mineralização óssea (2).

A produção de leite de cabra, assim como a de leite bovino, deve estar embasada tanto no adequado manejo higiênico-sanitário, quanto no rigoroso controle de qualidade, para garantir a inocuidade do produto e de seus derivados. No entanto, um dos entraves à produção leiteira bovina e caprina é a ocorrência de mastite, que se caracteriza por processo inflamatório da glândula mamária, podendo ser de origem tóxica, traumática, alérgica,

metabólica ou infecciosa, sendo esta última a mais frequente e importante (3,4). Diversos micro-organismos podem estar associados a casos de mastite, como bactérias, fungos, leveduras, algas e vírus, entretanto os de origem bacteriana são os mais frequentes (3).

A mastite pode apresentar curso clínico ou subclínico e a sua prevalência em caprinos varia entre 22 e 75%, sendo que os casos subclínicos são os mais frequentes (5), causando prejuízos que geralmente passam despercebidos pelos criadores, especialmente quando o diagnóstico da forma subclínica não é realizado. A queda na produção leiteira, o descarte prematuro de animais, os custos com medicamentos, o descarte do leite, o aumento dos custos com mão-de-obra e honorários veterinários, entre outras despesas (6) são fatores que mantêm a mastite como a mais importante causa de perdas econômicas do setor leiteiro (7).

Outro aspecto importante a ser considerado é o risco iminente à saúde pública considerando que diversos agentes infecciosos envolvidos são potencialmente patogênicos para humanos. Os micro-organismos mais comumente isolados em casos de mastite caprina são similares aos da mastite bovina, em caprinos, assim como em bovinos, os patógenos mais frequentemente encontrados são os estafilococos (5). *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) são os mais comumente isolados (8) seguidos de *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp. e *Pasteurella* spp. (6).

Para isolamento e caracterização dos agentes etiológicos das mastites, o teste padrão utilizado é o cultivo microbiológico, fundamental para o diagnóstico, profilaxia e controle dessa afecção (9,10). Micro-organismos, como *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), apresentam resistência a diversos antibióticos. Estudos ressaltam a importância da utilização do antibiograma como método de diagnóstico importante para o direcionamento correto no tratamento de mastites (4). Culturas de amostras de leite total de rebanhos ou de tanques de expansão também têm sido utilizadas para estudos e identificação de patógenos específicos como *S. aureus* e *Streptococcus agalactiae* (11).

Uma forma de controle empregada em caso de enfermidades infecciosas de origem bacteriana como as mastites é o uso de antimicrobianos. No entanto, se o tratamento for realizado de forma indiscriminada, pode desencadear a seleção de micro-organismos resistentes, dificultando o controle das mastites. Vale ressaltar ainda que a resistência bacteriana, bem como a presença de resíduos de antimicrobianos no leite e em derivados, representam sérios problemas para a saúde pública (12).

Para evitar o uso indiscriminado e abusivo de antimicrobianos no tratamento das mastites, recomenda-se a realização do antibiograma, a partir dos isolados obtidos das amostras de leite dos rebanhos. Apesar de ser um teste *in vitro*, o antibiograma possibilita o direcionamento do tratamento, por meio da escolha de princípios ativos que melhor atuem contra os micro-organismos isolados (4).

Considerando a relevância da produção leiteira caprina no Brasil, bem como a importância dos estafilococos como patógenos causadores de mastites em caprinos, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de sensibilidade de isolados de estafilococos de casos subclínicos de mastite em rebanhos caprinos do Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Reisolamento dos micro-organismos

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Pesquisa em Mastites (NUPEMAS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ/UNESP- Botucatu-SP.

Foram avaliadas 86 amostras de *Staphylococcus* spp., isolados de casos de mastite caprina subclínica que se encontravam estocadas a -80°C, em caldo cérebro coração (BHI) adicionado de glicerol a 10%. As mesmas foram reisoladas em placas contendo ágar sangue

ovino a 5% e incubadas a 37°C, por 24 horas, sendo a seguir repicadas de 2-3 colônias para caldo BHI, incubando-se por 24 horas para posterior realização do antibiograma.

Antibiograma

Para a realização dos antibiogramas utilizou-se o método de difusão com discos (13) de oxacilina (1µg), cotrimoxazol (25µg), penicilina (10UI), enrofloxacina (5µg), cefalexina (30µg), gentamicina (10µg), neomicina (30µg), ciprofloxacina (5µg), tetraciclina (30µg) e ampicilina (10µg). Interpretação dos halos de inibição foi de acordo com *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) (14).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A distribuição das diferentes espécies de estafilococos avaliadas está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de *Staphylococcus* isoladas a partir de leite de cabras com mastite subclínica. Botucatu-SP, 2015.

Micro-organismos	Número de isolados	% frente ao total de isolados
<i>Staphylococcus</i> spp. (SCN)*	44	51,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	26,7
<i>Staphylococcus intermedius</i>	14	16,3
<i>Staphylococcus hyicus</i>	3	3,5
<i>Staphylococcus lutrae</i>	1	1,2
<i>Staphylococcus schleiferi</i>	1	1,2
Total	86	100

*Estafilococos coagulase-negativa

Staphylococcus coagulase-negativa (SCN) foram os micro-organismos mais frequentes encontrados no presente estudo, corroborando com os resultados de da Silva et al. (15) que ao pesquisarem a suscetibilidade de espécies de *Staphylococcus* em cabras com mastite subclínica no Nordeste do Brasil, identificaram 60% de SCN e 37% de *S. aureus*. Peixoto et al. (5) da mesma forma encontraram maior frequência de SCN (29,9%).

Os resultados do perfil de sensibilidade *in vitro* frente aos antimicrobianos testados nas 86 cepas de *Staphylococcus* spp. são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade microbiana de estafilococos isolados do leite caprino de casos de mastite subclínica. Botucatu-SP, 2015.

Antimicrobiano	R	%	PS	%	S	%
Ampicilina	32	37,2	-	-	54	62,8
Penicilina	24	27,9	-	-	62	72,1
Tetraciclina	21	24,4	8	9,3	57	66,3
Oxacilina	9	10,5	1	1,2	76	88,4
Enrofloxacina	6	7,0	-	-	80	93,0
Cotrimoxazol	4	4,7	7	8,1	75	87,2
Cefalexina	4	4,7	-	-	82	95,3
Gentamicina	3	3,5	-	-	83	96,5
Ciprofloxacina	-	-	5	5,8	81	94,2
Neomicina	-	-	4	4,7	82	95,3

*R: resistentes; PS: parcialmente sensíveis; S: amostras sensíveis; %: em relação ao número total de isolados.

Verificou-se que mais de 70% das cepas de estafilococos apresentaram sensibilidade frente a oito dos dez antimicrobianos testados. O antimicrobiano mais efetivo *in vitro* foi a gentamicina, com 96,5% das cepas sensíveis; seguido de cefalexina e neomicina, com 95,3% dos isolados sensíveis a cada um dos antimicrobianos.

Os três antimicrobianos aos quais os micro-organismos apresentaram maior resistência foram ampicilina, penicilina e tetraciclina. Da mesma forma, Moroni et al. (16) constataram reduzida sensibilidade dos estafilococos à tetraciclina. Apesar da tetraciclina de longa ação ter sido comumente indicada para o tratamento dos casos de mastites em caprinos devido ao seu amplo espectro de ação (17), os resultados recentes de resistência bacteriana frente a este antimicrobiano demonstram a sua reduzida eficácia, restringindo a indicação de uso nos rebanhos.

Em estudo realizado por Garino Júnior et al. (18), foi avaliado o perfil de sensibilidade *in vitro* de cepas de *Staphylococcus* isoladas de mastite caprina no semiárido paraibano. No estudo desses autores, os índices de sensibilidade variaram de 80% a 90%. Cefalexina e oxacilina, foram efetivas em 85,75% e 83,33% dos isolados de *Staphylococcus*. Esses dados corroboram com o presente estudo, com elevado índice de sensibilidade, com 96,5% e 88,4% de sensibilidade para os mesmos fármacos. No presente estudo, a maioria dos isolados (70%) apresentou sensibilidade a oito dos dez antimicrobianos testados. Ressalta-se a importância do uso de testes complementares ao antibiograma, como a concentração inibitória mínima (CIM), para correta dosagem do antimicrobiano a ser utilizado, evitando-se assim a multiresistência e garantindo a eficácia no tratamento das mastites (18).

Os resultados do perfil de sensibilidade *in vitro* das diferentes espécies de estafilococos coagulase-positiva e negativa avaliados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de leite caprino a partir de casos de mastite subclínica. Botucatu-SP, 2015.

Antimicrobiano	S. <i>aureus</i> %	S. <i>hyicus</i> %	S. <i>intermedius</i> %	S. <i>lutrae</i> %	S. <i>schleiferi</i> %	SCN %
Ampicilina	30,4	33,3	64,3	-	100,0	81,8
Cefalexina	100,0	66,7	85,7	100,0	100,0	97,7
Ciprofloxacina	87,0	66,7	100,0	-	100,0	97,7
Cotrimoxazol	60,9	100,0	100,0	100,0	100,0	95,5
Enrofloxacina	78,3	100,0	100,0	-	100,0	100,0
Gentamicina	100,0	66,7	85,7	100,0	100,0	100,0
Neomicina	100,0	66,7	85,7	100,0	100,0	97,7
Oxacilina	100,0	66,7	78,6	100,0	100,0	86,4
Penicilina	60,9	33,3	57,1	-	100,0	86,4
Tetraciclina	78,3	-	64,3	100,0	100,0	63,6

Dentre os estafilococos coagulase-positiva, o mais frequentemente isolado foi *S. aureus* (26,7%), com 100% de sensibilidade frente à cefalexina, gentamicina, neomicina e oxacilina, corroborando os resultados de Langoni et al. (6), que avaliando o perfil de sensibilidade microbiana de *S. aureus* isolados a partir do leite caprino, verificaram maior sensibilidade do patógeno frente à gentamicina e oxacilina.

Os SCN isolados apresentaram 100,0% de sensibilidade frente à enrofloxacina e gentamicina. Em estudos realizados por Neves et al. (19), Lima Júnior et al. (20) e Peixoto et al. (5) foram obtidos resultados semelhantes aos do presente estudo para gentamicina.

CONCLUSÃO

Micro-organismos do gênero estafilococos são frequentemente isolados de casos de mastite caprina, especialmente os SCN, e a resistência *in vitro* dessas cepas frente a antimicrobianos como a ampicilina, a penicilina e a tetraciclina, alertam para alterações do perfil de sensibilidade destes patógenos ao longo dos anos. Estes antimicrobianos foram amplamente recomendados para o tratamento de rebanhos caprinos leiteiros e sua eficácia pode estar comprometida limitando sua indicação. A realização do diagnóstico precoce das mastites em caprinos e seu tratamento baseado no perfil de sensibilidade microbiana aumentam a possibilidade de êxito no tratamento de mastites, evitando-se a ocorrência de casos crônicos e a seleção de micro-organismos multirresistentes.

REFERÊNCIAS

1. Andrade NPC, Peixoto RM, Nogueira DM, Krewer CC, Costa MM. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus* spp coagulase negativa de um rebanho leiteiro caprino em Santa Maria da Boa Vista – PE. *Med Vet.* 2012;6:1-6.
2. Díaz-Castro J, Alférez MJM, López-Aliaga I, Nestares T, Campos MS. Effect of calcium-fortified milk-rich diets (either goat's or cow's milk) on copper bioavailability in iron-deficient anemia. *Dairy Sci Technol.* 2011;91:203-12.
3. Bradley AJ. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet J.* 2002;164:116-28.
4. Freitas MFL, Pinheiro Júnior JW, Stamford TLM, Rabelo ASS, Silva DR, Silveira Filho VM, 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. *Arq Inst Biol.* 2005;72:171-7.
5. Peixoto RM, Mota RA, Costa MM. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. *Pesq Vet Bras.* 2010;30:754-62.
6. Langoni H, Domingues PF, Baldini S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Rev Bras Cien Vet.* 2006;13:51-4.
7. Nader Filho A, Ferreira LM, Amaral LA, Rossi Júnior OD, Oliveira RP. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. *Arq Inst Biol.* 2007;74:1-4.
8. Rodrigues Silva CS, Villaça CLPB, Peixoto RM, Mota RA, Ribeiro MF, Costa MM. Antibacterial effect of Brazilian brown propolis in different solvents against *Staphylococcus* spp isolated from caprine mastitis. *Cien Anim Bras.* 2012;13:247-51.
9. Medeiros ES, Pinheiro Júnior JW, Peixoto RM, Silva Filho AP, Mota RA. Avaliação do exame microbiológico, Califórnia Mastitis Test e Somaticell® no diagnóstico da mastite subclínica em bovinos leiteiros. *Med Vet.* 2008;2:16-22.
10. Langoni H, Laurino F, Faccioli PY, Silva AV, Menozzi BD. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. *Vet Zootec.* 2009;16:708-15.

11. Brito MAVP, Brito JRF, Souza M, Vargas OL. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesq Vet Bras.* 1998;18:39-44.
12. Mota RA, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42:465-70.
13. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966;45:493-6.
14. CLSI – Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA: CLSI; 2005.
15. da Silva ER, Siqueira AP, Martins JCD, Ferreira WPB, Silva N da. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Rumin Res.* 2004;55:45-9.
16. Moroni P, Pisoni G, Antonini M, Ruffo G, Carli S, Varisco G, et al. Subclinical mastitis and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from two Italian Herds. *J Dairy Sci.* 2005;88:1694-704.
17. Mota RA. Aspectos epidemiológicos, diagnóstico e controle das mastites em caprinos e ovinos. *Tecnol Cien Agropec.* 2008;2:57-61.
18. Garino Jr F, Camboim EKA, Das Neves PB, De Sá AVV, Almeida AP. Suscetibilidade a antimicrobianos e produção de betalactamase em amostras de *Staphylococcus* isolados de mastite caprina no semiárido paraibano. *Arq Inst Biol.* 2011;78:103-7.
19. Neves PB, Medeiros ES, Sá VV, Camboim EKA, Garino Jr F, Mota, RA, et al. Perfil microbiológico, celular e fatores de risco associados à mastite subclínica em cabras no semiárido da Paraíba. *Pesq Vet Bras.* 2010;30:379-84.
20. Lima Júnior AD, Nader FA, Vianni MCE. Sensibilidade "in vitro" dos *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos*, isolados em casos de mastite caprina, à ação de antibióticos e quimioterápicos. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 1993;45:291-6.

Recebido em: 18/06/2014

Aceito em: 24/04/2015