

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM ISOLADOS DE AMOSTRAS DE LEITE PROVENIENTE DE BOVINOS LEITEIROS COM MASTITE

Gabriel da Silva Paiva (PIBIC/UEM), Sheila Rezler Wosiacki (Orientador), e-mail: gabrielpaiva395@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrárias /Umuarama, PR.

**Área e subárea:** Medicina Veterinária – Medicina Veterinária Preventiva

**Palavras-chave:** Susceptibilidade, antibiótico, animais de produção.

### Resumo:

A mastite é um dos motivos pelo qual se utiliza extensamente antimicrobianos, com isso, tem-se notado o surgimento de cepas resistentes, e estudos que avaliam o perfil de resistência antimicrobiana, associado a avaliações genéticas são de extrema importância para seu uso criterioso. Neste trabalho, foram analisados os dados de antibiogramas de 40 isolados bacterianos, seguido de avaliação da *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) para quatro antibióticos e revisão dos principais genes de resistência antimicrobiana envolvidos na mastite bovina. Vários gêneros bacterianos foram estudados, e destes, foi encontrada maior resistência a partir do teste de disco-difusão para a ampicilina, com 100% das bactérias da ordem *Enterobacterales* resistentes, 75% para as bactérias do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus* e 50% para as do gênero *Staphylococcus*. Em relação ao valor de MIC, os maiores valores foram encontrados para Sulfametoxazol + trimetoprim, com MIC superior a 64 µg/ml para o gênero *Staphylococcus*, sendo que para a ordem *Enterobacterales* os valores foram superiores à 32 µg/ml e 8 µg/ml para os gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*. Com isso, preconiza-se que seja utilizado de forma criteriosa os antimicrobianos, visto que a resistência é um problema de saúde única.

### Introdução

A mastite é definida como uma inflamação da glândula mamária cuja etiologia envolve uma variedade de agentes. Decorrente desse processo inflamatório, há alterações organolépticas, físico-químicas, na celularidade do leite e alterações patológicas no parênquima mamário (MEGID; RIBEIRO; PAES, 2016).

Em relação à resistência bacteriana, o uso inadequado destes agentes, associados a falhas nos manejos de ordenha, podem promover a disseminação de cepas resistentes entre o rebanho, além de haver possíveis transferências de resíduos de antibióticos no leite, gerando menor qualidade do leite e grande problema na saúde pública (MOTA *et al.*, 2005).

Há vários estudos que demonstram que grande parte dos isolados bacterianos causadores de mastite em bovinos possuem elevados graus de resistência antimicrobiana, como, por exemplo, *Staphylococcus* spp. apresentando *resistência à meticilina* (MRSA), sendo classificados como *Multidrug resistance* (MDR) e apresentando genes de resistência, como gene *mecA*, *tet*, entre outros (DINIZ, 2010; DORNELES *et al.*, 2019). Diante disso, buscar evidenciar padrões de resistência bacteriana e acompanhar o perfil genético destas, podem ser elementos de grande valia para o combate de mastite em bovinos leiteiros.

## Materiais e métodos

Para a realização desta pesquisa, foram analisadas por meio das técnicas de MIC 40 cepas bacterianas mantidas na Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Animal da Universidade Estadual de Maringá (UEM), Campus Regional de Umuarama (CAU). As cepas bacterianas foram isoladas de amostras de leites, provenientes de bovinos leiteiros com mastite, atendidos por órgãos externos durante o período de 2016 a 2020.

Foi analisado os dados do teste de susceptibilidade antimicrobiana disponíveis e posteriormente foi feita a realização da MIC, sendo executada por microdiluições em Caldo Mueller Hinton (CMH), segundo CLSI (2013), utilizando-se 10 diluições de cada antibiótico mais um controle negativo e um controle positivo. Os antibióticos testados foram ampicilina, enrofloxacin, gentamicina e sulfametoxazol + trimetoprim. A leitura da MIC foi realizada por fluorescência com solução de resazurina 0,05%.

Em relação à parte genotípica, foi realizada uma revisão bibliográfica dos principais genes de resistência associadas a mastite em bovinos leiteiros, seguidas de comparação com o perfil de resistência encontrado na presente pesquisa.

## Resultados e Discussão

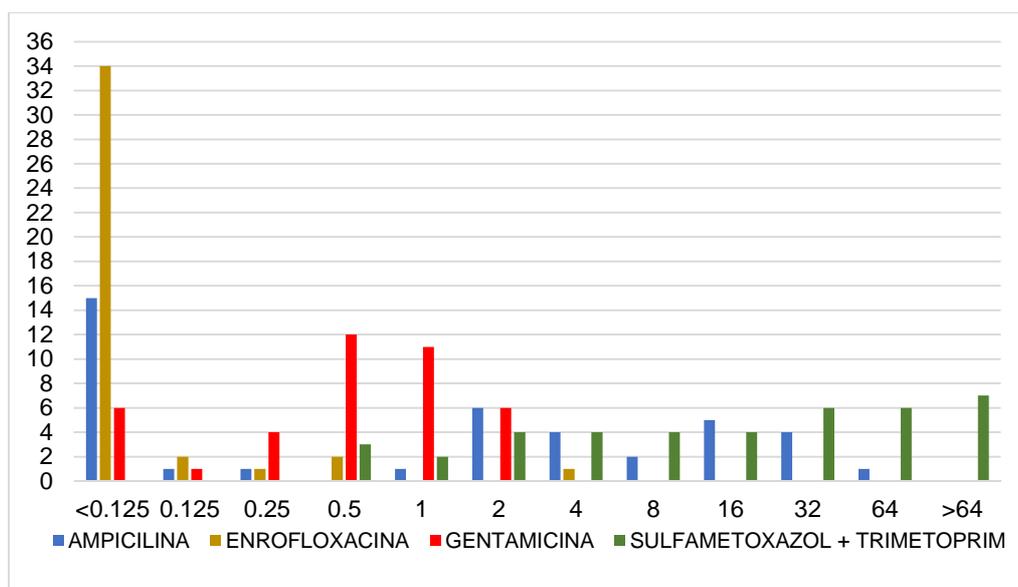
Foram coletados os dados de 40 bactérias e realizado o MIC, sendo estas: 30 do gênero *Staphylococcus*, 6 da ordem *Enterobacterales* e quatro dos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Em relação aos dados dos testes de susceptibilidade antimicrobiana já realizados, os maiores índices de resistência foram identificados para a classe das penicilinas, sendo que as bactérias de ordem *Enterobacterales* apresentaram resistência de 100% à essa classe, seguido das bactérias do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus*, com 75% de resistência e o gênero *Staphylococcus* apresentou resistência de 50%, corroborando com o trabalho de Zimermann e Araújo (2017), que também encontraram maior resistência para a classe das penicilinas nas bactérias estudadas.

A classe dos aminoglicosídeos e sulfonamidas apresentaram alta sensibilidade ao antibiograma frente às bactérias estudadas, assemelhando-se com os dados de Uisenheimer *et al.* (2021). Em relação às quinolonas, estas demonstraram resistência moderada aos isolados, sendo que os gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* apresentaram maior resistência, com 50%, seguido da ordem *Enterobacterales* com resistência de 33,33%; o

gênero *Staphylococcus* não apresentou resistência à esta classe. Ainda, a produção biofilme foi identificada em 87,5% (35) dos isolados.

No que diz respeito à MIC (figura 1), para o gênero *Staphylococcus*, o antimicrobiano que apresentou maior MIC foi o sulfametoxazol + trimetoprim, sendo sete isolados com MIC superior à 64 µg/ml, quatro com valores de 64 µg/ml e 32 µg/ml; ainda com MIC de 32 µg/ml, dois isolados apresentaram este resultado frente a ampicilina, podendo estes valores mais elevados estarem atrelados à produção do gene *bla<sub>Z</sub>*, assim como no identificado em isolados de *Staphylococcus aureus* por Borges *et al.* (2020).



**Figura 1** – Distribuição dos valores de MIC para todas as bactérias isoladas de casos de mastite bovina.

Da mesma forma, algumas bactérias da ordem *Enterobacterales* apresentaram valores de MIC superiores a 32 µg/ml para os antimicrobianos sulfametoxazol + trimetoprim e ampicilina, assemelhando-se aos resultados obtidos por Clermont *et al.* (2013), os quais encontraram valores de MIC entre 1-8 µg/ml para a classe das aminopenicilinas testadas e valores entre 32-256 µg/ml para a classe das sulfonamidas, apresentando ainda genes de virulência.

Além disso, outras quatro bactérias apresentaram valor de MIC de 32 µg/ml para os antimicrobianos já mencionados, sendo dois para cada agente. Em relação aos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*, estes apresentaram os maiores valores de MIC para sulfametoxazol + trimetoprim, com concentração variando de 4-8 µg/ml, bem como a ampicilina que um isolado apresentou valor de 4 µg/ml.

Com valores menores de MIC, a enrofloxacina e gentamicina foram os antibióticos com menores concentrações de inibição de crescimento encontradas nas bactérias deste estudo, uma vez que os resultados variaram de <0,125-2 µg/ml.

## Conclusões

Tendo em vista que os agentes antimicrobianos estão se tornando um grande problema na cadeia produtiva mundial, bem como no tratamento de mastite, deve-se preconizar sempre o tratamento criterioso, seguido de testes de susceptibilidade antimicrobiana. Além dos testes de disco-difusão, associar com estudos de MIC e PCR são importantes para melhor avaliar os microrganismos envolvidos nestas infecções.

### Agradecimentos

Agradeço ao apoio financeiro dado pelo UEM, bolsa PIBIC-UEM.

### Referências

BORGES, L. F. F.; *et al.* Caracterização genotípica de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina isolados de tetos e leite bovino. **Agrarian Sciences Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2020.

CLERMONT, O.; CHRISTENSON, J. K.; DENAMUR, E.; GORDON, D. M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environ Microbiol Rep**, v. 5, n. 1, p. 58-65, 2013.

DINIZ, C. M. *et al.* Resistência à oxacilina em *Staphylococcus* spp. isolado de leite mastítico. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 482-488, 2010.

DORNELES, E. M. S. *et al.* Genetic diversity and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase - negative *Staphylococcus* isolates from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil. **Microbiologopen**, v. 8, n.5, p. 1-7, 2019.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**: 1 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

MOTA, R. A. *et al.* Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

UISENHEIMER, B. C.; *et al.* Perfil de sensibilidade antimicrobiana de cepas *Streptococcus uberis* isoladas de mastite bovina na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Antimicrobial. Brazilian Journal of Development**. V. 7, n. 3, p. 22549-22557, 2021.

ZIMERMANN, K. K.; ARAÚJO, M. E. M. MASTITE BOVINA: AGENTES ETIOLÓGICOS E SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS. **Revista Ciências Exatas e da Terra e Ciências Agrárias**, v. 12, n.1, p. 1-7, 2017.