

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE *Staphylococcus* spp. ISOLADOS NO LEITE DE VACAS DURANTE E APÓS TRATAMENTO NÃO CONVENCIONAL DA MASTITE

Larissa Cristina Brassolatti¹, Camila Chioda da Almeida², Elka Machado Ferreira³, Tereza Cristina Alves⁴, Luiz Francisco Zafalon⁴.

¹Graduação em Medicina Veterinária, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, São Paulo. ²Departamento de Patologia Reprodução e Saúde Única da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Campos Jaboticabal. ³Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, FCAV-Unesp, Jaboticabal, São Paulo. ⁴Pesquisadores - Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, São Paulo

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é um processo inflamatório da glândula mamária que altera a qualidade e a produção de leite. A doença pode se apresentar sob a forma clínica, caracterizada por alterações visíveis no leite e na glândula mamária do animal; e a subclínica, quando não há alterações macroscópicas na glândula mamária e no leite. Em ambas a causa é principalmente infecciosa e exames laboratoriais são necessários para a identificação da etiologia infecciosa (Oliveira e Medeiros, 2015).

Staphylococcus spp. estão entre os principais patógenos causadores de mastite. Eles podem estar presentes no leite de vacas em lactação e na pele dos animais, além de estarem envolvidos em casos de intoxicações alimentares causadas pela ingestão de leite contaminado. Apresentam capacidade de formação de biofilmes que contribuem para a resistência antimicrobiana, ocasionando dificuldades ao tratamento (Damasceno et al., 2020).

Em rebanhos criados sob manejo de produção orgânica, estudos relacionados com o comportamento dos micro-organismos causadores da mastite são necessários, devido a carência de informações sobre a epidemiologia da doença. Desse modo, mais informações podem ser disponibilizadas com relação à permanência de agentes infecciosos nos rebanhos. A caracterização mais detalhada do patógeno causador da mastite pode contribuir com a avaliação da possibilidade de transmissão dos microrganismos e o desenvolvimento da doença, fornecendo informações importantes para a escolha de métodos apropriados de profilaxia e terapia, mesmo em rebanhos submetidos a tratamentos não convencionais (Kot et al., 2016).

Objetivou-se investigar a ocorrência e os perfis de suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados no leite de vacas tratadas com homeopatia e em lactação posterior sem o tratamento, além de genes ligados à resistência antimicrobiana.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de leite foram coletadas de um rebanho composto por 50 vacas em lactação durante e após tratamento homeopático da mastite com formulação à base de *Belladonna* (12 CH), *Hepar Sulphur* (12 CH), *Silicea* (12 CH), *Phosphorus* (12 CH) e *Phytolacca decandra* (12 CH). As vacas foram submetidas aos procedimentos de lavagem dos tetos antes da ordenha com água clorada e, em seguida, a secagem com papel toalha descartável foi realizada. Posteriormente foi feita a antisepsia préordenha com produtos à base de cloro. Os animais foram submetidos ao *California Mastitis Test* (CMT) para o diagnóstico de mastite subclínica e a etiologia infecciosa da doença foi confirmada laboratorialmente, com a semeadura das amostras de leite em placas de Petri contendo ágar sangue. Realizou-se a observação macroscópica das colônias, em

conjunto com as características morfo-tintoriais e bioquímicas. Somente foram considerados como positivos os casos em que a contagem de células somáticas do leite era superior a 200.000 células/mL. Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados por meio da técnica de disco-difusão a partir de discos impregnados conforme recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute*. Os princípios ativos utilizados foram Penicilina (10µg), Gentamicina (10µg), Enrofloxacin (5µg), Ciprofloxacina (5µg), Norfloxacina (10µg), Eritromicina (15µg), Nitrofurantoína (300µg), Tetraciclina (30µg), Doxiciclina (30µg), Sulfazotrim (25µg), Oxacilina (1µg), Cefalexina (30µg) e Sulfametoxazol (25 µg). A confirmação das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas previamente foi realizada por meio de testes moleculares. A investigação de genes de resistência *mecA* e *blaZ* também foi realizada por meio de testes moleculares, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para a sua identificação. As mudanças nos padrões de resistência antimicrobiana no período de tempo estudado foram analisadas por meio do teste de Qui-Quadrado ($P=0,05$). A frequência de casos de mastite causada por *Staphylococcus* spp. foi obtida pelo coeficiente de morbidade prevalente, expresso pelo número de casos da doença existente no momento e nos locais de realização do trabalho relacionados com as populações existentes naqueles determinados momentos e locais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período em que o tratamento homeopático estava sendo realizado no rebanho, as espécies de *Staphylococcus* identificadas no leite de vacas com mastite foram *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus chromogenes*. Posteriormente à realização do tratamento, na lactação em que a homeopatia não mais estava sendo usada, *Staphylococcus* spp. continuaram a ser isolados no leite em vacas com a doença. As prevalências mensais de mastite subclínica estafilocócica no período do tratamento com homeopatia variaram de 10,9% a 24,4%, enquanto no período em que os animais não estavam sendo tratados houve uma variação de 5,9% a 15,0%.

S. aureus isolados no leite de vacas sob tratamento homeopático apresentaram resistência *in vitro* ao sulfazotrim, penicilina, tetraciclina e gentamicina. *S. epidermidis* apresentou padrão de resistência semelhante ao *S. aureus*. No período em que as vacas não estavam em tratamento, isolados classificados como *S. aureus* apresentaram resistência à penicilina, nitrofurantoína, tetraciclina, doxiciclina e sulfazotrim.

As alterações nos padrões de resistência antimicrobiana entre os períodos com e sem tratamento foram analisadas para a doxiciclina, penicilina e tetraciclina, uma vez que para os demais princípios ativos antimicrobianos os micro-organismos não apresentaram resistência antimicrobiana *in vitro* e não foi possível a análise pelo teste estatístico utilizado. Não houve diferença nos perfis de suscetibilidade para os microorganismos quando comparados os períodos em que a homeopatia foi usada e quando essa forma de tratamento deixou de ser usada.

Genes ligados à resistência antimicrobiana foram identificados em frequência superior nos isolados durante o tratamento com homeopatia, o que indica a presença de micro-organismos com potencial de resistência antimicrobiana neste período. A presença do gene *blaZ* foi identificada durante o tratamento homeopático em 32/32,6%, 14/14,3% e 14/14,3% isolados classificados como *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. chromogenes*, respectivamente. O gene *mecA* foi identificado somente em *S. epidermidis*, em um total de 12 isolados (12,2%). Nos micro-organismos isolados no período posterior ao tratamento, o gene *blaZ* foi identificado em um isolado (7,1%) classificado como *Staphylococcus* coagulase-negativo, em que não foi possível identificar a espécie, além de outros dois micro-organismos (14,3%) identificados como

S. aureus. Na lactação em que não estava sendo realizado o tratamento homeopático, houve ausência do gene *mecA* nos micro-organismos investigados.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Staphylococcus spp. apresentaram resistência antimicrobiana *in vitro* durante o tratamento homeopático e na lactação posterior, quando o rebanho não estava sob este tipo de tratamento, bem como genes relacionados com esta característica. A ocorrência da mastite causada por *Staphylococcus* spp. em ambos os períodos sugere que o tratamento homeopático não controla esses micro-organismos e que eles permanecem no rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Damasceno, V.S. et al. Análise do perfil microbiológico de agentes causadores de mastite bovina e sua relação com a qualidade do leite em uma fazenda no Sul de Minas Gerais. **Brazilian Journal of Development**, v.6, p.91409-91421, 2020.
- Kot, B. et al. Virulence gene profiles in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with subclinical mastitis in eastern Poland. **Journal of Dairy Research**, v.83, p.228-235, 2016.
- Oliveira, M.R.M.; Medeiros, M. Agentes causadores de mastite e resistência bacteriana. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.2, n.1, p.45-60, 2015.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo Fapesp nº 2020/09470-3.