FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ANA LUISA COSTA MARTINS

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORES DE MASTITE CAPRINA

JOAO PESSOA
2022

ANA LUISA COSTA MARTINS

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORES DE MASTITE CAPRINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Santana de Moura

JOAO PESSOA

2022

ANA LUISA COSTA MARTINS

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E SANITIZANTES DE ISOLADOS BACTERIANOS CAUSADORES DE MASTITE CAPRINA

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC, apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Santana de Moura

Aprovado em _____ de _____ de 2022.

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Guilherme Santana de Moura - Orientador

_____

Profª Drª Maiza Araújo Cordão – Membro da banca

_____

Prof. Dr. Nilton Guedes do Nascimento Júnior – Membro da banca

JOAO PESSOA

2022

M341r Martins, Ana Luisa Costa

Resistência a antimicrobianos e sanitizantes de isolados bacterianos causadores de mastite caprina / Ana Luisa Costa Martins. – João Pessoa, 2022.

34f.

Orientador: Profº. Dr. Guilherme Santana de Moura.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade Nova Esperança - FACENE

1. Caprinocultura. 2. Glândula Mamária. 3. MALDI-TOF. 4. Staphylococcus. I. Título.

Dedicatória

Esse trabalho foi dedicado à minha mãe, que me incentivou a começar o curso e confiou nas minhas escolhas, ao meu pai, que sempre esteve disposto a me ajudar e me apoiar quando precisei.

AGRADECIMENTOS

A elaboração desse trabalho de conclusão de curso contou com a ajuda de várias pessoas, dentre elas dedico meus sinceros agradecimentos:

Aos professores do curso de medicina veterinária por ter paciência e dedicação para transmitir seus conhecimentos da melhor forma possível.

Ao professor orientador Dr. Guilherme Santana de Moura, que idealizou esse trabalho e se propôs a me acompanhar e auxiliar na concepção desse projeto.

À Dra. Michele Flávia Sousa Marques que orientou e deu acesso às ferramentas necessárias para a elaboração da pesquisa.

Aos professores integrantes da banca examinadora: Profª Drª Maiza Araújo Cordão e Prof. Dr. Nilton Guedes do Nascimento Júnior que aceitaram o convite para avaliar esse trabalho.

Aos meus colegas de curso que estiveram do meu lado e me incentivaram a estudar mais e aprimorar meus conhecimentos em cursos, palestras e trabalhos acadêmicos.

Aos meus pais, Rogério Pereira Martins e Luciana da Costa Ferreira por me educarem bem e serem meus maiores exemplos de honestidade, esforço e persistência.

Ao meu companheiro e amigo Danilo César Candeia da Fonseca que sempre me apoiou e foi meu maior confidente e suporte durante todo o meu percurso acadêmico.

APÍGRAFE

A grandeza de uma nação e seu progresso moral podem ser julgados pela forma como seus animais são tratados.

Mahatma Gandhi

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo analisar a resistência a antimicrobianos e sanitizantes de isolados bacterianos causadores de mastite em caprinos leiteiros. O estudo foi realizado no setor de caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus III, localizada no município de Bananeiras, Paraíba onde foram coletadas 60 amostras de leite de 30 cabras em diferentes estágios de lactação para a realização dos seguintes testes: isolamento e identificação bacteriana através de cultura e técnica Maldi-tof, avaliação de resistência das amostras bacterianas aos desinfetantes comerciais da marca DeLaval utilizados no *pós-dipping* (iodo a 0,6%; clorexidine a 2,0% e ácido lático a 2,0%) em três diferentes tempos de exposição (15", 30" e 60"), avaliação do perfil de sensibilidade das amostras a antimicrobianos através da inoculação em placas com ágar Müller Hinton e mensuração dos halos de inibição formados ao redor dos discos de antibióticos: gentamicina, sulfadiatrina, ceftiofur, ciprofloxacina, marbofloxacina, neomicina, penicilina e tetraciclina das marcas BD BBL™ e BD Difco™. O resultado do teste Microbiológico revelou que em 15 das 60 amostras coletadas, foi observado crescimento de colônias bacterianas e através do exame MALDI – TOF foi revelado que 100% (15/15) dos isolados se tratavam de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. onde 46,7% (7/15) foram classificados como *Staphylococcus* não-aureus (SNA) e 53,3% (8/15) como *Staphylococcus aureus* (SA). O perfil de sensibilidade dos isolados aos desinfetantes demonstrou que, para o iodo, nos tempos de 15”, 30” e 60”, obtiveram-se 80,0%, 86,7% e 93,3% de sensibilidade respectivamente. Quanto a clorexidine, observaram-se 86,7%, 93,3% e 100% de sensibilidade respectivamente aos tempos referidos anteriormente. Com relação ao ácido lático, 40%, 53,3% e 73,3% foram sensíveis nos tempos já citados. O perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos demonstrou que o ceftiofour, a gentamicina e a marbofloxacina obtiveram 100% de sensibilidade tanto para os SA quanto para os SNA, a ciprofloxacina obteve 100% de sensibilidade para os SA e 85,7% para os SNA, a neomicina 62,5% para os SA e 85,7% para os SNA, a sulfadiatrina 62,5% para os SA e 71,4% para os SNA, a tetraciclina 62,5% para os SA e 42,8% para os SNA e, por fim, a penicilina com sensibilidade de apenas 12,5% para os SA e 28,6% para os SNA. Concluiu-se então que os agentes microbiológicos que causam mastite no rebanho em questão são bactérias do gênero *Staphylococcus*, a melhor atividade desinfetante *in vitro* frente aos *Staphylococcus* spp. foi observada para os ativos clorexidine e iodo, apresentando melhor ação de forma proporcional ao maior o tempo de exposição dos isolados aos reagentes e a gentamicina e a marbofloxacina apresentaram excelentes resultados *in vitro* frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, podendo ser utilizados como alternativas para o tratamento das mastites no rebanho em questão.

Palavras chave: caprinocultura, glândula mamária, MALDI-TOF, *Staphylococcus*.

ABSTRACT

The present work aims to analyze the resistance to antimicrobials and sanitizers of bacterial isolates causing mastitis in dairy goats. The study was carried out in the goat farming sector of the Federal University of Paraíba (UFPB), campus III, located in the Bananeiras, Paraíba, where 60 milk samples from 30 goats at different stages of lactation were collected for the following tests: bacterial isolation and identification through culture and Maldi-tof technique, evaluation of bacterial samples resistance to commercial DeLaval brand disinfectants used in post-dipping (iodine at 0.5%; chlorhexidine at 2.0% and lactic acid at 2,0%) at three different exposure times (15", 30" and 60"), evaluation of the sensitivity profile of samples to antimicrobials through inoculation on plates with Müller Hinton agar and measurement of inhibition zones formed around the antibiotics disks: gentamicin, sulfadiathrin, ceftiofur, ciprofloxacin, marbofloxacin, neomycin, penicillin and tetracycline from the brands BD BBL™ and BD Difco™. The result of the Microbiological test revealed that in 15 of the 60 samples collected, bacterial colonies growth was observed and through the MALDI - TOF exam it was revealed that 100% (15/15) of the isolates were bacteria of the genus *Staphylococcus* spp. where 46.7% (7/15) were classified as non-aureus *Staphylococcus* (NAS) and 53.3% (8/15) as *Staphylococcus aureus* (SA). The sensitivity profile of the isolates to disinfectants showed that, for iodine, at times of 15”, 30” and 60”, 80.0%, 86.7% and 93.3% sensitivity were obtained, respectively. As for chlorhexidine, 86.7%, 93.3% and 100% sensitivity were observed, respectively, at the times mentioned before. For lactic acid, 40%, 53.3% and 73.3% were sensitive at the times mentioned previously. The sensitivity profile of Staphylococcus spp. to antimicrobials showed that ceftiofour, gentamicin and marbofloxacin obtained 100% sensitivity for both SA and NAS, ciprofloxacin obtained 100% sensitivity for SA and 85.7% for NAS, neomycin 62.5 % for AS and 85.7% for NAS, sulfadiathrin 62.5% for AS and 71.4% for NAS, tetracycline 62.5% for AS and 42.8% for NAS and, finally, penicillin with a sensitivity of only 12.5% for AS and 28.6% for NAS. It was then concluded that the microbiological agents that cause mastitis in the herd in question are bacteria of the genus *Staphylococcus,* the best disinfectant activity *in vitro* against *Staphylococcus spp*. was observed for the chlorhexidine and iodine, showing better action in proportion to the longer the exposure time of the isolates to the reagents and gentamicin and marbofloxacin showed excellent *in vitro* results against the *Staphylococcus spp.* analyzed and can be used as alternatives for the treatment of mastitis in the herd in question.

Key words: Dairy Goat, mammary gland, MALDI-TOF, *Staphylococcus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do exame MALDI – TOF para a frequência de detecção dos organismos nas amostras enviadas.....25
Tabela 2: Perfil de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus spp*. frente aos desinfetantes iodo (0,6%), clorexidine (2%) e ácido lático (2%).....27
Tabela 3: Relação entre a sensibilidade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus* não-aureus (SNA).....28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10
2. OBJETIVOS 12
2.1 Objetivo Geral 12
2.2 Objetivos Específicos 12
3. REVISÃO DE LITERATURA 13
3.1 Caprinocultura leiteira no Nordeste 13
3.2 Leite de cabra 14
3.3 Mastite caprina. 14
3.3.1 Introdução 15
3.3.2 Etiologia: 15
3.3.3 Epidemiologia: 17
3.3.4 Patogenia: 17
3.3.5 Diagnóstico: 18
3.3.6 Controle e prevenção: 20
3.3.7 Tratamento: 21
4. METODOLOGIA 22
4.1 Animais 22
4.2 Coleta de leite 22
4.3 Isolamento e identificação bacteriana 22
4.4 Perfil de sensibilidade aos desinfetantes 23
4.5 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos 24
4.6 Análise Estatística 24
4.7 Aspectos Éticos 24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 25
5.1 Resultados Microbiológico e MALDI – TOF 25
5.2 **Perfil de sensibilidade aos desinfetantes** 26
5.3 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos 28
6. CONCLUSÃO 30
REFERÊNCIAS 31

1. INTRODUÇÃO

Mastite é o nome atribuído à inflamação da glândula mamária, é a principal doença que acomete rebanhos leiteiros, apresentando elevada prevalência (LANGONI *et al.*, 2011). Os impactos desta enfermidade estão relacionados à diminuição da produção de leite e da qualidade dos seus derivados, descarte precoce de animais, além de custos com mão de obra, profissionais e medicamentos (LANGONI *et al.*, 1998).

Diversos agentes etiológicos podem estar envolvidos nos casos de mastite, no entanto, dentre os patógenos bacterianos, *Staphylococcus* spp. é o mais frequente (LANGONI *et al*., 1998; MARTINS *et al*., 2010). Este gênero bacteriano é causador de mastite do tipo contagiosa, sendo largamente disseminado de matrizes infectadas para as sadias durante a ordenha. *Staphylococcus* spp., na maioria das vezes, atinge a glândula mamária através da superfície de tetos higienizados inadequadamente, equipamentos, utensílios de ordenha e mãos contaminadas de ordenhadores (CHYE *et al*., 2004).

Tradicionalmente estafilococos são divididos em duas categorias: *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), que geralmente compõem a microbiota natural dos seres humanos e animais, e *Staphylococcus* coagulase positivo (SCP), que apresentam maior potencial patogênico, tendo como principal representante a espécie *Staphylococcus aureus* (HIRSH & ZEE, 1999; NEVES *et al.*, 2007). Essa classificação baseia-se na capacidade do microrganismo coagular o plasma, sendo considerado um importante fator de patogenicidade dos estafilococos.

Epidemiologicamente, é importante a identificação da etiologia da mastite (ABAD et al., 2013), tanto para rastrear a origem da infecção, quanto para implementar adequado tratamento e controle. No caso específico das mastites bacterianas, o tratamento de eleição é a antibioticoterapia. Porém, o uso excessivo ou indiscriminado de antimicrobianos aumenta o risco de gerar resíduos da droga no leite e de propiciar o surgimento de cepas resistentes ao antimicrobiano, o que pode gerar problemas para a saúde humana (RAIA JUNIOR, 2001; ROLLIN, 2001; TETZNER, 2005).

Controlar a mastite nos rebanhos é essencial para obter leite de melhor qualidade, garantindo alimento seguro (LANGONI *et al*., 2011). Nesse contexto, medidas sanitárias devem ser adotadas durante o processo de ordenha para minimizar a transmissão de agentes causadores de mastites aos animais e também ao leite, pois a presença desses agentes pode prejudicar a qualidade microbiológica do leite (AMARAL *et al.*, 2004). Uma das medidas recomendadas é o uso adequado de agentes desinfetantes de tetos que são utilizados no pré e

pós-*dipping*, com o objetivo de reduzir a população de micro-organismos patogênicos e evitar a potencial disseminação de agentes infecciosos (RAMALHO *et al.*, 2012), o que tende a controlar e até mesmo diminuir os riscos de novas infecções da glândula mamária (MEDEIROS *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e identificar os principais agentes causadores de mastite em um rebanho caprino e avaliar a resistência desses isolados frente a desinfetantes que são utilizados na realização de *pós-dipping* e antimicrobianos que são comumente utilizados para o tratamento de mastite.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar quais agentes estão presentes nos casos de mastite caprina do rebanho em questão assim como sua frequência de detecção;
- Obter informações importantes sobre a capacidade antimicrobiana dos antibióticos e detergentes utilizados no controle da mastite caprina;
- Identificar os desinfetantes e antimicrobianos mais efetivos no controle e prevenção da mastite caprina.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CAPRINOCULTURA LEITEIRA NO NORDESTE

Adaptados a condições climáticas adversas, os caprinos foram uma das primeiras espécies de ruminantes a serem domesticadas pelo homem, com evidências de rebanhos datando de cerca de 8 mil anos antes de cristo (ETHIER *et al.*, 2017). No Brasil, os caprinos foram trazidos primeiramente para a região nordeste em torno do ano 1535 d.C. por colonizadores portugueses (JAINUDEEN *et al.* 2004, apud AQUINO *et al.*, 2016). No Nordeste, a caprinocultura pôde se estabelecer com sucesso, visto que, 7.667.319 dos 8.260.607 animais que compõe o efetivo do rebanho caprino brasileiro estão no Nordeste (IBGE 2017).

No Nordeste o caprino se tornou uma espécie de importância não apenas econômica, mas também sociocultural uma vez que a caprinocultura é parte integrante da identidade cultural nordestina onde a cabra é considerada "um símbolo da conquista e adaptação aos sertões nordestinos pela sua seleção natural" (FREITAS MENESES, 2020).

No entanto, a caprinocultura na região semiárida não possui uma gestão adequada, onde são comuns altas taxas de mortalidade e morbidade, causadas principalmente por falta de sanidade dos rebanhos, o que leva a prejuízos financeiros (SOTOMAIOR *et al*., 2007, apud AQUINO *et al.*, 2016).

No âmbito econômico, a criação de caprinos é a principal fonte de renda de vários pequenos produtores das regiões semiáridas do Nordeste, sendo na agricultura familiar onde se encontram a maioria dos animais, os quais, muitas vezes, servem como forma de subsistência (LOBO *et al.,* 2019). Apesar disso, o mercado de produtos de origem caprina está crescendo e se tornando mais exigente, isso devido à procura do consumidor por um produto diferenciado, com valor agregado, nutracêuticos ou ''gourmet'' (CORDEIRO *et al.,* 2016). Desse modo, ocorre o aumento da demanda, isso se reflete numa necessidade do produtor de aumentar e melhorar a produção para se encaixar nos parâmetros de mercado. Dessa forma, estão surgindo criações mais especializadas e tecnificadas, o que de um lado impulsiona o mercado e de outro gera concorrência com o sistema de criação tradicional já enraizado na cultura nordestina.

Os sistemas de criação de caprinos leiteiros mais utilizados atualmente no Nordeste são aqueles onde são criados na mesma propriedade outras espécies animais concomitantemente aos caprinos, como ovinos e bovinos, por exemplo, conceituando um sistema misto. Além disso,

a maioria dos animais são criados no modelo semiextensivo, onde eles são mantidos em áreas de pasto nativo, com pouco manejo e intervenção (CORDEIRO *et al.*, 2016).

Na região nordeste a maioria dos rebanhos caprinos não possui raça definida, apesar de serem comummente observados animais mestiços das raças Alpina, Alpina Americana, Alpina Britânica, Toggenburg, Anglo-nubiana e Murciana (Maia *et al*., 2010). No entanto, quando se busca um animal com boa aptidão leiteira se destacam aqueles das raças Saanen, Parda-alpina, Toggenburg e Anglo-nubiana as quais são consideradas especializadas na produção de leite (SENAR, 2020).

3.2 LEITE DE CABRA

Define-se como Leite de cabra, segundo a instrução normativa nº 37, de 31 de outubro de 2000, "o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados", quanto às características sensoriais, a instrução normativa supracitada dispõe que o leite de cabra deve ter cor branca, sabor e odor característico e aspecto líquido ou, quando for o caso, congelado.

Quanto à composição do leite, os constituintes principais são água, gordura, lactose, proteínas, caseína, albumina, globulina, nitrogênio não proteico e resíduo mineral fixo (PARK *et al.*, 2007), podendo sofrer alteração devido a fatores como raça, indivíduo, dieta, número de parição, estágio de lactação, estação do ano, manejo, condições ambientais, localidade, saúde do úbere, ordenha e posteriores condições de manipulação e conservação (GARCIA; TRAVASSOS, 2011).

Estudos comprovam que o leite de cabra possui ótimo valor nutritivo e alta digestibilidade, também hipoalergênico, o que o torna uma excelente opção para pessoas com alguma intolerância a leite de vaca, sendo esse um problema comum, principalmente em crianças e idosos (GARCIA; TRAVASSOS, 2011). Esses fatores levam ao aumento no interesse para a produção de caprinos leiteiros, assim como para o melhoramento e tecnificação da caprinocultura nacional, gerando, desse modo, mais renda e ofertas de emprego para a população rural, visto que a produção de laticínios de origem caprina decorre, em grande maioria, de pequenos produtores. No entanto, o leite é um alimento propício à propagação de bactérias, o que pode gerar problemas na sanidade do rebanho, perdas econômicas e mesmo riscos à saúde pública (SANTOS, 2005).

3.3 MASTITE CAPRINA.

3.3.1 Introdução

Dentre as enfermidades que afetam a caprinocultura, a mastite é mais recorrente nos rebanhos leiteiros sendo um fator limitante para a produção de leite (DAMIANA; VALENTE, 2015). Mastite é o nome dado à inflamação da glândula mamária, a qual causa alterações no leite como: redução da produtividade e qualidade e alterações físicas, químicas e microbiológicas, além disso, a mastite pode gerar disfunções da glândula mamária podendo acarretar na perda total da capacidade secretora e, também, na morte do animal acometido. Para mais, a mastite é considerada a afecção que provoca as maiores perdas econômicas para a produção leiteira (ALENCAR SANTOS, *et al.*, 2019), pois incumbe ao produtor gastos com tratamento veterinário, perdas no rendimento, além da morte e descarte de animais (PEIXOTO; MOTA, COSTA, 2010).

A mastite pode ser detectada em duas fases: a fase clínica sendo caracterizada por sinais clínicos evidentes de inflamação (rubor, dor ao toque, alterações no leite como a presença de grumos ou flocos) e a fase subclínica a qual representa uma inflamação não sintomática, necessitando assim de testes de campo e laboratoriais para o seu diagnóstico (ACOSTA *et al.*, 2016).

3.3.2 Etiologia:

A mastite pode ocorrer como resposta a múltiplos fatores como: agressões físicas, químicas ou microbianas. Dentre esses fatores, as infecções por bactérias equivalem a 90% das causas de mastite (BERGONIER *et al.*, 2003).

As principais bactérias causadoras de mastite clínica nos caprinos e problemas relacionados à qualidade do leite são as pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (ACOSTA *et al.*, 2016), essas bactérias têm formato de cocos e se agrupam em formações que lembram a aparência de um cacho de uvas, são bactérias gram positivas, imóveis, não esporogênicas e geralmente são catalase positiva e oxidase negativa. São quimioorganotróficos, ou seja, obtém energia através do metabolismo respiratório e fermentativo de carboidratos, resistem à lise por lisozima e são susceptíveis à lise por lisistafina, sendo relacionados à pele, mucosas e glândulas dos animais homeotérmicos (SILVA, et al., 2017).

O gênero *Staphylococcus* divide-se em dois grupos com características distintas, os, *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), que possuem a capacidade de produzir a enzima coagulase e os *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), que não possuem essa capacidade. A enzima coagulase age sobre o fibrinogênio presente no sangue convertendo-o em fibrina, formando assim um coágulo que tem a função de proteger as bactérias dos fagócitos e as isola das outras defesas do hospedeiro (FERRASSO, 2015). Quanto à patogenicidade, os SCP são os mais relevantes, em especial a espécie *Staphylococcus aureus*, a qual é o isolado bacteriano mais frequente nas amostras de leite bovino, caprino e ovino de animais com mastite no Brasil (ACOSTA *et. al*., 2016).

O *S. aureus* é uma bactéria Gram positiva, anaeróbia facultativa, possui parede celular, motilidade negativa, catalase e coagulase positivo. Essas bactérias fazem parte da microbiota da pele e mucosa nasal dos humanos tendo como consequência a contaminação das mãos e disseminação através da manipulação, tendo assim um papel importante na transmissão de infecções através de alimentos. Além disso, os estafilococos possuem grande interação entre o ser humano, animais e ambiente sendo altamente adaptados para infectar diversas espécies e também podem adquirir genes responsáveis por aumentar os fatores de patogenicidade (FREITAS *et al.*, 2021), esses genes podem ser provenientes de outros *s. aureus* ou até mesmo outras espécies de estafilococos como, por exemplo, os *S. sciuri* os quais são SCN porém possuem a capacidade de transmitir um fragmento genômico denominado *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) que pode ser disseminado facilmente entre diferentes espécies bacterianas por meio de contaminação cruzada direta (KHAZANDI *et al.*, 2018). O SCCmec é um elemento cromossômico móvel capaz de carregar o gene *Methicillin resistance gene* (mecA) que promove resistência à maioria doa antibióticos β-lactâmicos através da codificação de uma proteína alternativa de ligação à penicilina (PBP2a/PBP2') (PATERSON, 2020).

O *S. sciuri* é uma bactéria que, desde a última década, está sendo reconhecida como um importante patógeno para a mastite bovina, visto que os *S. sciuri* possuem baixa especificidade, infectando desde plantas a animais e seres humanos e, além de causar mastite em animais, também é um patógeno oportunista de seres humanos (KHAZANDI *et al.*, 2018).

3.3.3 Epidemiologia:

A mastite bacteriana pode ter origem contagiosa ou ambiental. Na forma contagiosa, em rebanhos bovinos, os micro-organismos causadores são popularmente conhecidos como “vaca dependentes”, ou seja, necessitam da glândula mamária de outros animais como forma de reservatório sendo transmitidas de um animal infectado para o outro principalmente através de fômites de uso comum entre os animais como, por exemplo, os equipamentos de ordenha ou mesmo as mãos dos ordenhadores. A forma de transmissão ambiental é aquela em que as bactérias patogênicas estão presentes no ambiente em que o animal é mantido como, por exemplo, salas de ordenha, currais e camas, onde o contágio bacteriano ocorre principalmente após a ordenha (LANGONI *et al.*, 2015).

Entre os fatores de risco para infecções intramamárias em rebanhos de cabras leiteiras destaca-se o estágio da lactação, sendo observado, em estudos, maior frequência de mastite em animais que se encontram em lactação a vários dias, além disso, fêmeas de terceira e quarta ordem de parto se mostraram mais susceptíveis à mastite (PEIXOTO; MOTA, Rinaldo Aparecido; COSTA, Mateus M. Da, 2010).

3.3.4 Patogenia:

O início da enfermidade se dá quando as bactérias se inserem nos ductos do teto e o curso clínico da doença vai depender da capacidade dos microrganismos de colonizar e se reproduzir no úbere, do grau de virulência da cepa e da imunidade do hospedeiro. A patogênese da mastite pode ser resumida a cinco estágios: o primeiro, onde a bactéria adentra o canal do teto; o segundo, quando ocorre multiplicação bacteriana no leite; o terceiro, ocorrendo o acesso microbiano ao ducto coletor e ao seio lactífero dos alvéolos.

De forma que o quarto estágio é onde há resposta do hospedeiro à multiplicação bacteriana gerando reação dos leucócitos causando, em alguns casos, a formação de edema e abscesso; o quinto estágio se refere à morte das células do epitélio glandular o qual é substituído por um tecido fibroso devido à ação da enzima coagulase que transforma o fibrinogênio em fibrina, esse tecido fibroso age como uma proteção para a bactéria pois reduz a fagocitose bacteriana pelos neutrófilos do hospedeiro. Além disso, muitas estirpes de *S. aureus* podem produzir exotoxinas as quais causam irritação química ao epitélio glandular, dentre essas

toxinas destacam-se: alfa e beta hemólise, toxinas esfoliativas, enterotoxinas estafilocócicas e a toxina da síndrome de choque tóxico (ACOSTA *et al*., 2016).

No entanto, a produção de enterotoxinas não se limita apenas às espécies de *S. aureus*. Estudos demonstraram que algumas espécies de SCN têm o potencial de produzir toxinas na ausência de condições laboratoriais, por exemplo: *S. xylosus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *V. korea Cocci*, *S. warneri*, *S. sciuri* e *S. lentus*. Contudo, as leucotoxinas produzidas pelos SCN são consideradas ineficazes ou ocorrem em pequenas quantidades, ao contrário do *Staphylococcus aureus*, o qual tem a capacidade de produzir múltiplas leucotoxinas. Além disso, foi demonstrado, em estudos, que os *Staphylococcus aureus* obtidos de caprinos e ovinos são mais leucotóxicos do que aqueles obtidos de bovinos. Todavia, nesses mesmos estudos, observou-se que os leucócitos polimorfonucleares dos caprinos e ovinos demonstram maior resistência aos efeitos leucotóxicos em comparação aos leucócitos dos bovinos (PEIXOTO; MOTA, Rinaldo Aparecido; COSTA, Mateus M. Da, 2010).

Dentre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, existem também aquelas capazes de produzir biofilme, o qual consiste em um aglomerado de bactérias aderidas a uma superfície e envolvidas por uma matriz extracelular (CALLAHAN, 2010). Esse biofilme protege a bactéria contra agentes externos e promove sua fixação e multiplicação e, consequentemente, a persistência da infecção (FERREIRA *et al*., 2014), sendo outro fator importante a se considerar quando se suspeita da presença de infecções estafilocócicas.

Desse modo, se torna imprescindível o diagnóstico precoce da mastite e de seus microrganismos causadores por meio do desenvolvimento de técnicas moleculares para rápida identificação destes patógenos, objetivando facilitar o seu controle (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

3.3.5 Diagnóstico:

Os métodos de diagnóstico da mastite podem ser indiretos ou diretos, isso se refere à forma que a doença é detectada onde os exames indiretos baseiam-se na observação dos sinais clínicos e critérios de evolução de intensidade da inflamação, e os exames diretos visam identificar o agente etiológico por meio de testes laboratoriais que comprovem a presença de microrganismos em amostras de leite, onde tem-se a avaliação da cultura bacteriana do leite como o teste padrão ouro para o diagnóstico das infecções da glândula mamária em espécies leiteiras (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

A cultura microbiológica é a principal forma de análise microbiológica de alimentos, tendo como objetivo detectar ou enumerar microrganismos vivos. Existem dois tipos de ensaios para avaliar os meios de cultura, são eles: ensaios qualitativos, os quais objetivam verificar a presença ou a ausência de microrganismos específicos em uma amostra, sem que seja feita uma contagem, e ensaios quantitativos que visam determinar a quantidade de microrganismos alvo na amostra utilizando, na maioria das vezes, indicadores de massa ou volume. Em pesquisas, geralmente são feitos diversos ensaios, isso se dá pela grande variedade de grupos, gêneros e espécies que podem estar presentes em uma amostra (SILVA, et al., 2017).

A técnica base para o diagnóstico indireto das mastites em todas as espécies de gado leiteiro é a contagem de células somáticas (CCS). Desse modo, a CCS é muito difundida para a avaliação do status sanitário da glândula mamária em cabras e ovelhas. No entanto, para as cabras leiteiras, a CCS é naturalmente maior do que as outras espécies de ruminantes leiteiros além de possuir também um alto componente apócrino na secreção do leite e elevado número de fatores não infecciosos que podem aumentar a contagem de células somáticas em cabras, o que pode levar a um diagnóstico errôneo de mastite. Por esse motivo, diversos trabalhos foram realizados tendo em vista a determinação da CCS de cabras não infectadas, porém não se obteve resultados satisfatórios devido à grande quantidade de fatores que interferem na aferição da CCS (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

Visto que cada gênero, espécie e estirpe bacteriana possui diferentes potenciais patogênicos e modos de infecção, faz-se necessária a identificação correta do microrganismo envolvido para que sejam empregados métodos de tratamento e prevenção adequados. Para tanto existem diversos métodos para a detecção e diferenciação biológica, dentre eles, a cultura bacteriana á mais utilizada para garantir um diagnóstico definitivo sendo considerada como método preciso e sensível, todavia esta técnica pode demandar muito tempo dependendo do microrganismo inoculado (PASTERNAK, 2012). A cultura bacteriana consiste em coletar uma amostra e colocá-la sobre um meio adequado para que quaisquer bactérias presentes na amostra se multipliquem (MOURA *et al*., 2020), desse modo, facilitando a observação da presença de microrganismos e a coleta desses para a realização de testes.

Por esse motivo, buscam-se técnicas de identificação mais rápidas e que não precisem necessariamente do crescimento microbiano, um exemplo é a técnica Maldi-TOF *(Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*), que apresenta resultados precisos e rápidos, embora seja ainda pouco difundida no Brasil. Segundo PASTERNAK (2012) Essa técnica consiste em “ uma aplicação da espectrometria de massa à microbiologia: o material biológico é colocado em uma placa com matriz e bombardeado com um laser que o evapora;

um sistema ioniza e aspira o material volatilizado, que chega a detectores, os quais registram o tempo em que a substância chega ao detector e sua quantidade. Cada patógeno tem um espectro característico que é analisado por um software" onde já se pode ter resultados precisos de 5 a 15 minutos.

3.3.6 Controle e prevenção:

Após a detecção de uma bactéria de potencial patogênico, fazem-se necessários procedimentos para o tratamento dos indivíduos infectados e medidas de profilaxia para evitar demais infecções, sendo o protocolo sanitário uma forma de prevenção vantajosa, se feito corretamente. Um dos passos para estabelecer um protocolo sanitário efetivo é a escolha dos detergentes a serem utilizados. Para que um desinfetante seja considerado ideal ele precisa ter: resultados satisfatórios, bom custo benefício, estabilidade, longo prazo de validade, segurança química e alta capacidade de inibição bacteriana (NETO *et al*., 2021). Diversos estudos foram realizados a fim de determinar a eficácia dos detergentes mais usados em rebanhos de bovinos leiteiros, principalmente daqueles à base de iodo e clorexidina (DE ALENCAR SANTOS *et al*., 2019; MARTINS *et al*., 2017; PEIXOTO et al., 2019). No entanto, visto que o leite bovino e o leite caprino têm composição diferente e consequentemente capacidade para a proliferação de microbiota distinta, se torna relevante a elaboração de novas pesquisas sobre o potencial germicida dos desinfetantes.

O iodo é um dos desinfetantes com melhor custo-benefício para a realização de pré e pós-*dipping*, com resultados satisfatórios em programas de controle de mastite subclínica principalmente relacionada a infecção por *Staphylococcus spp.*, utilizado pela maioria dos produtores visto que existem diversas soluções de iodo vendidas no mercado nacional, tornando a utilização do iodo mais prática e acessível. No entanto, o uso desse desinfetante em maiores concentrações pode deixar resíduos no leite e causar agressão química ao epitélio das tetas, além disso, foram observados, em estudos, menores índices de sensibilidade do iodo comercialmente vendido para os estafilococus coagulase negativa (NETO *et al.*, 2021).

A clorexidina é muito utilizada para o tratamento de infecções superficiais de tetos em bovinos pois permanece na pele por mais de 6 horas com um efeito cumulativo e contínuo, além de causar menor irritação da pele quando comparado ao iodo, ser de fácil aplicação, ter um bom custo benefício e ter boa eficácia contra os *S. aureus*. Outro agente antimicrobiano com bons resultados em pesquisas é o ácido lático, onde, nessas pesquisas, obteve maior eficácia *in vitro*

para os estafilococus coagulase positiva do que o iodo e a clorexidina (MEDEIROS, et al., 2009).

3.3.7 Tratamento:

Os antibióticos de escolha mais utilizados para o tratamento das mastites em pequenos ruminantes são de aplicação intramamária, isso porque esse modo de aplicação permite que sejam administradas pequenas quantidades de agentes antimicrobianos onde a infecção está instaurada. Quanto à escolha do antibiótico envolvido é necessário atentar à possibilidade de que a medicação cause mudanças na composição e qualidade do leite como, por exemplo: aumento do sódio e cloro e redução de cálcio, fósforo, proteína e gordura. Para mais, a presença de antibióticos no leite, mesmo em pequenas quantidades, pode acarretar problemas de saúde para população (COSTA *et al.*, 2013) principalmente relacionados a resistência bacteriana.

Os beta-lactâmicos são os medicamentos mais usados em todo o mundo para tratar a mastite e outras doenças infecciosas, seja em bovinos, caprinos, ovinos, búfalos ou outras espécies (FEJZIĆ *et al.*, 2014). É importante destacar que a resistência antimicrobiana está subindo para níveis perigosamente elevados devido ao uso regular desses medicamentos (FERNANDES *et al.*, 2013) sendo relatadas altas taxas de resistência aos beta-lactâmicos entre patógenos isolados de mastite em búfalas, cabras e ovelhas na região Nordeste do Brasil, onde, dentre esses isolados, a produção de betalactamase é o mecanismo de resistência mais ativo, o que pode pressupor uma resistência bacteriana mesmo às classes mais estáveis desses antibióticos (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010).

4. METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS

Foram colhidas amostras de leite de 30 cabras da raça Saanen em diferentes estágios de lactação do rebanho pertencente ao setor de caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), campus III, localizada no município de Bananeiras, localizado na latitude -6.74775 e longitude -35.6246, na região do Brejo do estado da Paraíba.

4.2 COLETA DE LEITE

Inicialmente, foi realizado o teste da caneca de fundo escuro para identificação dos casos de mastite clínica, onde os primeiros jatos de leite colhidos por ordenha manual são depositados em uma caneca de fundo preto para observar se há presença de grumos ou outras alterações no leite que sugiram a presença de mastite clínica, e, em seguida, procederam-se as coletas do leite para exame microbiológico através de ordenha manual após prévia higienização do teto com solução *pré-dipping* a base de clorexidina, secagem com papel toalha e antissepsia do óstio do teto com álcool a 70ºGL. Foram coletados aproximadamente 5 ml de leite por metade mamária de cada cabra totalizando 60 amostras, em tubos esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e a metade mamária, enviados sob refrigeração em caixas de material isotérmico contendo gelo reciclável, para a realização do exame microbiológico no laboratório da UFPB.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Alíquotas de leite foram semeadas em placas de Petri contendo ágar-base enriquecido com 5% de sangue de ovino. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37º C e as leituras realizadas 24 e 48 horas após a incubação. Para a identificação das bactérias isoladas, foram observadas as características morfológicas das colônias como tamanho, tipo, coloração e presença de hemólise e, ao microscópio, foram observadas a disposição das células e características morfotintoriais ao Teste de Gram (CARTER, 1988).

Os isolados foram transferidos para placas de ágar Muller Hinton, embalados em caixa térmica com gelo reciclável e enviados à Clínica do Leite na cidade de Piracicaba – SP para

realização da identificação das espécies bacterianas através da técnica de espectrofotometria de massa MALDI – TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*) de acordo com o descrito por Croxatto, Prod'hom e Greub, 2012.

As amostras bacterianas foram preparadas como descrito anteriormente por Schulthess *et al*. (2014). As colônias foram transferidas diretamente para uma placa de aço polido com 96 alvos (Bruker Daltonics) e cobertas com 1 µL de uma solução saturada de matriz de ácido-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) (Bruker Daltonics). Os espectros de massa foram obtidos e analisados utilizando um espectrômetro de massa microflexo LT (Bruker Daltonics) em combinação com versões RUO (Research-use-Only) do pacote de software MALDI Biotyper (versão 3.0) e a base de dados de referência V.3.1.2.0 (3.995 entradas). Foram comparados os espectros de massa das amostras com os espectros de massa de referência no banco de dados, calculando um valor (escore) entre 0 e 3, refletindo a semelhança entre a amostra e o espectro de referência, exibindo os 10 principais registros de bancos de dados correspondentes.

4.4 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS DESINFETANTES

Para avaliar a ação de desinfetantes utilizados no pós-*dipping* foram utilizados os seguintes princípios ativos: iodo (0,6%), clorexidine (2,0%), e ácido lático (2,0%) sendo as diluições realizadas conforme orientação do fabricante (Delaval Brasil, Jaguariuna – SP). Para a análise foram preparadas suspensões bacterianas homogêneas de solução salina estéril (5,5ml) correspondendo ao tubo 1 da escala de McFarland. A suspensão foi constituída pela solução desinfetante (0,8ml) diluída de acordo com o fabricante (Delaval Brasil, Jaguariuna – SP) e o leite estéril (0,2ml). Posteriormente, foi adicionada a suspensão bacteriana (1,2ml) e cronometraram-se os tempos (15", 30" e 60") de exposição para então realizar o repique em caldo BHI, como descrito por (RAMALHO *et al.*, 2012). A mistura foi incubada a 37°C durante 24 horas para observação da turvação do meio, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos. Após a incubação, a suspensão foi repicada em meio sólido (Ágar sangue) para confirmação da presença ou ausência do micro-organismo testado frente aos diferentes desinfetantes e tempo de exposição, onde a ausência do crescimento bacteriano nas placas indica a eficácia do produto em questão (COSTA *et al*., 1998).

4.5 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Os isolados foram submetidos ao antibiograma em placas de Petri, contendo ágar Müller Hinton seguindo metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). Foram então testadas as seguintes drogas: gentamicina, sulfadiatrina, ceftiofur, ciprofloxacina, marbofloxacina, neomicina, penicilina e tetraciclina através da colocação de discos desses antibióticos sobre o ágar Müller Hinton, e consequente mensuração dos halos de inibição que surgiram ao redor dos discos de antimicrobianos de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante (Difco & BBL – BD, Nova Jersey – EUA).

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism versão 7.04 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA) e Epi Info ™ versão 7.2 para Windows (software Epi Info ™, Atlanta, Geórgia, EUA). O teste $\chi 2$ foi utilizado para verificar a significância estatística nas frequências de eficácia dos desinfetantes, resistência antimicrobiana e valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI) para as diferentes espécies estudadas. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas para $P < 0,05$.

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado sob os aspectos éticos de experimentação animal sob o protocolo CEUA UFPB 6968030221.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS MICROBIOLÓGICO E MALDI – TOF

Os exames microbiológicos detectaram que, das 60 amostras coletadas, foi observado crescimento de colônias bacterianas em 15 amostras. A frequência de detecção dos organismos nas amostras enviadas para a realização do exame MALDI – TOF está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Resultado do exame MALDI – TOF para a frequência de detecção dos organismos nas amostras enviadas.

(continua)

Nome da amostra	Identificação da amostra	Organismo com melhor equivalência	*Score Value*	Organismo com segunda melhor equivalência	*Score Value*
G2101	#1	*S. sciuri*	2.31	*S. sciuri*	2.01
G2102	#2	*S. aureus*	2.14	*S. aureus*	2.04
G2103	#3	*S. aureus*	2.28	*S. aureus*	2.18
G2104	#4	*S. sciuri*	2.26	*S. sciuri*	2.01
G2105	#5	*S. sciuri*	2.23	*S. sciuri*	2.09
G2106	#6	*S. aureus*	2.19	*S. aureus*	2.02
G2107	#7	*S. aureus*	2.25	*S. aureus*	2.02
G2108	#8	*S. epidermidis*	2.31	*S. epidermidis*	2.01
G2109	#9	*S. aureus*	2.12	*S. aureus*	2.02
G2110	#10	*S. aureus*	2.28	*S. aureus*	2.08
G2111	#11	*S. aureus*	2.23	*S. aureus*	2.03
G2112	#12	*S. epidermidis*	2.34	*S. epidermidis*	2.04
G2113	#13	*S. epidermidis*	2.51	*S. epidermidis*	2.01

(conclusão)

Nome da amostra	Identificação da amostra	Organismo com melhor equivalência	*Score Value*	Organismo com segunda melhor equivalência	*Score Value*
G2114	#14	*S. simulans*	2.27	*S. simulans*	2.07
G2115	#15	*S. aureus*	2.12	*S. aureus*	2.01

*Score value = Valor que indica a probabilidade de certeza na identificação dos microrganismos onde os valores maiores que 2.3 indicam alta probabilidade para a identificação de espécies, valores maiores que 2 e menores que 2.299 indicam boa detecção para gênero e provável identificação de espécie e valores abaixo de 1.7 indicam resultados não confiáveis (NORMAND *et al.*, 2017).

Os resultados do MALDI – TOF demonstraram que 53,3% (8/15) dos isolados de *Staphylococcus* spp. foram classificados como *S. aureus* e 46,7% (7/15) foram classificados como não-aureus (SNA) com três prováveis espécies: *S. sciuri* 20% (3/15), *S. epidermidis* 20% (3/15) e *S. simulans* 6,7% (1/15). Diversos estudos vêm apontando um crescimento da frequência de SNA como causa de mastite clínica e subclínica no mundo (MOON *et al*., 2007; PYÖRÄLÄ & TAPONEN, 2009; SCHUKKEN *et al*., 2009; FESSLER et al., 2010). Embora, na maioria dos casos, a reação inflamatória seja relativamente leve (WALLER *et al.*, 2012; MOURA, G.S. DE *et al.*, 2018).

Esta elevação no número de casos de mastite causada por SNA pode estar associada ao difícil controle das afecções mamárias com esta etiologia, uma vez que existe uma grande heterogeneidade deste grupo de microrganismos, sendo composto por mais de 15 espécies de SNA relacionadas à inflamação da glândula mamária (ACOSTA *et al.*, 2016)

Dentre este grupo de micro-organismos (SNA), a resistência antimicrobiana mais comum se dá através da produção de β-lactamases, que podem conferir resistência a penicilinas e a alguns aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos (TAPONEN *et al.*, 2016).

5.2 **Perfil de sensibilidade aos desinfetantes**

O perfil de sensibilidade dos 15 isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos desinfetantes iodo (0,6%), clorexidine (2%) e ácido lático (2%) está disposto na tabela 2.

Tabela 2: Perfil de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus spp*. frente aos desinfetantes iodo (0,6%), clorexidine (2%) e ácido lático (2%).

Desinfetante	**Tempo**		
	15''	**30''**	**60''**
Iodo 0,6%	80% (12/15)	86,7% (13/15)	93,3% (14/15)
Clorexidine 2%	86,7% (13/15)	93,3% (14/15)	100% (15/15)
Ácido Lático 2%	40% (6/15)	53,3% (8/15)	73,3% (11/15)

O perfil de sensibilidade de *Staphylococcus spp*. frente ao iodo nos tempos de 15", 30" e 60" foi de 80,0%, 86,7% e 93,3%, respectivamente. Quanto a clorexidine, observou-se, que 86,7 % foram sensíveis no tempo de 15" e que 93,3% foram sensíveis nos tempos de 30" e que com 60", todos os isolados foram sensíveis a ação desse desinfetante. Com relação ao ácido lático, 40%, 53,3% e 73,3% foram sensíveis nos tempos já citados anteriormente.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram maior atividade desinfetante *in vitro* do clorexidine e iodo, respectivamente. Em estudo semelhante, Medeiros *et al.* (2009), também encontraram o iodo e clorexidine com maior atividade desinfetante contra *Staphylococcus aureus* e iodo e ácido lático com melhor eficácia para *Staphylococcus* não-aureus (SNA). Em contrapartida, em estudo realizado por Ramalho *et al*. (2012), o clorexidine também apresentou ação desinfetante para *Staphylococcus aureus* e SNA, além disso, no mesmo estudo o iodo apresentou ação desinfetante inferior a clorexidine e ácido lático.

O clorexidine é bastante utilizado para o tratamento de infecções superficiais de tetos em vacas devido ao seu efeito cumulativo e contínuo, permanecendo na pele no mínimo por seis horas, além disso, atua na presença de matéria orgânica, é de fácil aplicação e econômico (SPINOSA *et al.* 2002). Neste estudo o iodo apresentou ação desinfetante inferior a clorexidine. De acordo com Fonseca e Santos (2000), os melhores resultados nos pós-*dipping* com iodo eram obtidos com as concentrações de 0,7 a 1,0%, porém, segundo Jones, (1998) soluções de iodo devem ser utilizadas para imersão de tetos em baixas concentrações (0,5% ou menos), uma vez que soluções a 1% podem deixar resíduo no leite.

Nesse estudo, os piores resultados de sensibilidade observados, dentre os desinfetantes utilizados, foram em relação ao ácido lático. Medeiros *et al*. (2009), observaram que 15,60%, 17,80%, 35,60% e 53,30% dos isolados de *S. aureus* foram sensíveis ao ácido lático nos tempos de 15", 30" 60" e 300"; porém o perfil de sensibilidade de SNA frente ao ácido lático foi de 72,7%, 72,7%, 90,9% e 100,0% nos referidos tempos, um dos desinfetantes mais eficientes para os SNA no estudo.

5.3 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O perfil de sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus* spp. isolados estão descritos na tabela 3:

Tabela 3: Relação entre a sensibilidade antimicrobiana frente aos *Staphylococcus aureus* (SA) e *Staphylococcus* não-aureus (SNA).

	Staphylococcus				
	aureus (n=8)		**não-aureus (n=7)**		
Antimicrobiano	F.A.*	%	F.A.*	%	**Valor de p***
Ciprofloxacina	8	100	6	85,7	0,648
Ceftiofour	8	100	7	100	0,600
Gentamicina	8	100	7	100	0,400
Marbofloxacina	8	100	7	100	0,151
Neomicina	5	62,5	6	85,7	0,137
Penicilina	**1**	**12,5**	**2**	**28,5**	**0,025**
Sulfadiatrina	5	62,5	5	71,4	0,304
Tetraciclina	**5**	**62,5**	**3**	**42,8**	**0,025**

*F.A.= Frequência absoluta; P= probabilidade

O perfil de sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. aos antimicrobianos demonstrou que o ceftiofour, gentamicina e marbofloxacina obtiveram 100% de sensibilidade tanto para os SA quanto para os SNA, no entanto, a marbofloxacina e a gentamicina se mostraram mais confiáveis que o ceftiofour devido ao menor valor de p, demonstrando assim menor chance de erro. Os demais antimicrobianos não tiveram resultados tão satisfatórios como os citados anteriormente onde, em ordem decrescente de efetividade, temos a ciprofloxacina com 100% de sensibilidade para os SA e 85,7% para os SNA, a neomicina com sensibilidade de 62,5% para os SA e 85,7% para os SNA, a sulfadiatrina com sensibilidade de 62,5% para os SA e 71,4% para os SNA, a tetraciclina com sensibilidade de 62,5% para os SA e 42,8% para os SNA e, por fim, a penicilina com sensibilidade de apenas 12,5% para os SA e 28,6% para os SNA.

No presente estudo, 87,5% (7/8) dos *Staphylococcus* aureus e 71,4% (5/7) *Staphylococcus* não-aureus foram resistentes à penicilina. Esta característica pode estar associada ao fato de as penicilinas serem um dos agentes antimicrobianos mais utilizados no mundo todo, sendo essa associação já descrita em outros trabalhos (OLIVER & MURINDA,

2012; WALLER *et al.*, 2012; MEHMETI *et al*., 2016). Os *Staphylococcus aureus*, de uma forma geral, expressam mais fatores de resistência frente aos antimicrobianos, principalmente ao grupo dos β-lactâmicos (MEHMETI *et al*., 2016), como foi observado no presente estudo.

Há de se considerar ainda que a penicilina é um antimicrobiano de uso frequente na região estudada (SANTOS *et al.*, 2020), especialmente nas mastites, mas também em outras doenças infeciosas dos ruminantes, resultando no uso elevado deste medicamento, o que pode contribuir para a seleção de micro-organismos resistentes a este fármaco nos rebanhos.

Em relação às tetraciclinas, os SNA demonstraram menor sensibilidade (42,8%) do que os *S. aureus* (62,5%). Alguns estudos relatam grande quantidade de *S. epidermidis* resistentes a tetraciclina, porém esse padrão de resistência é relativamente raro em outras espécies de SNA (OLIVER & MURINDA, 2012; MEHMETI *et al*., 2016; TAPONEN *et al*., 2016).

Por apresentar ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, frequentemente as tetraciclinas são utilizadas na terapêutica das mastites. Entretanto, observou-se alta taxa de resistência entre os isolados analisados, sobretudo entre os SNA. O uso indiscriminado, contínuo e prolongado de um mesmo antimicrobiano favorece o surgimento de cepas resistentes dentro de um rebanho (MOURA, Guilherme S. *et al.*, 2020).

No caso das tetraciclinas, soma-se ainda o fato de que os mecanismos de resistência são mediados por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, que podem carrear genes de resistência para vários antimicrobianos simultaneamente, além da possibilidade de transmissão destes plasmídeos entre gêneros de bactérias diferentes, representando um risco também à saúde pública (GIACINTI *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÃO

Em virtude dos fatos mencionados, conclui-se que os agentes microbiológicos que causam mastite no rebanho em questão são bactérias do gênero *Staphylococcus*, com grande semelhança quanto a quantidade de isolados das espécies *S. aureus* e não-aureus, demostrando assim a possibilidade de afecções mamárias causadas por SNA.

Quanto à sensibilidade aos desinfetantes utilizados no *pós-dipping*, a melhor atividade desinfetante *in vitro* frente aos *Staphylococcus* spp. foi observada para os ativos clorexidine e iodo, apresentando melhor ação de forma proporcional ao maior o tempo de exposição dos isolados aos reagentes.

Em relação aos antimicrobianos, a gentamicina e a marbofloxacina apresentaram excelentes resultados *in vitro* frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. analisados, podendo ser utilizados como alternativas para o tratamento das mastites no rebanho em questão.

O estudo epidemiológico dos agentes infecciosos envolvidos nas mastites é importante para o planejamento de ações de prevenção, controle e tratamento adequados, evitando maior custo com a utilização de medicamentos ineficazes.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. C. *et al*. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.

AMARAL, L.A.; ROMANO, A.P.M.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 24, n.4, p.173-177, 2004.

AQUINO, R. *et al.* A realidade da caprinocultura e ovinocultura no semiárido brasileiro: um retrato do sertão do Araripe, Pernambuco. **PubVet,** v. 10, n. 4, p. 271–281, abr. 2016.

BERGONIER, D. *et al*. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary research**, v. 34, n. 5, p. 689–716, out. 2003.

BRASIL. Instrução Normativa SDA - 37, de 31/10/2000. Dispõe sobre o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. **Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento**, 8 nov. 2000.

CALLAHAN, H. Improved DNA and RNA isolation from biofilms. **BioTechniques**, v. 48, n. 5, p. 413, 2010.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária.** Roca, São Paulo. 250p, 1988.

CHYE, F.Y.; ABDULLAH, A.; AYOB, M.K. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 535–541, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement.** Document M100-S16. Wayne, PA, CLSI, 2006.

CORDEIRO, A. G. P. C. et al. Sistemas de Produção de Caprinos Leiteiros. **Anais do 13o Workshop sobre Produção de caprinos na região da Mata Atlântica**, p. 11-35, 2016.

COSTA, C. R. de M. *et al.* Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **Pubvet**, v. 7, n. 8, abr. 2013.

COSTA, E.O. Importância da mastite na produção leiteira do Brasil. Ver. Educ. Contin. CRMV-SP, v. 1, n. 1, p.3-9, 1998.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. FEMS **Microbiology Reviews**. [S.l: s.n.]., mar. 2012

DE ALENCAR SANTOS, D. *et al.* Etiology and in vitro antimicrobial sensitivity of isolated bacteria from goats with mastitis in the Sertão and Cariri of Paraíba. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 20, 2019.

ETHIER, J. *et al*. Earliest expansion of animal husbandry beyond the Mediterranean zone in the sixth millennium BC. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.

FEJZIĆ, N., *et al*. Beta lactam antibiotics residues in cow's milk: comparison of efficacy of three screening tests used in Bosnia and Herzegovina. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences** 14, 155–159, 2014.

FERNANDES R, AMADOR P. e PRUDÊNCIO C. β-Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology** 24, 7–17, 2013.

FERRASSO, M. M. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE. **Arq. Inst. Biol.** [S.l.]: [s.n.], 2015.

FERREIRA, A. A. *et al*. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in Staphylococcus spp . isolated from a poultry processing plant. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 710–716, 2014.

FREITAS MENESES, VALDÊNIO. 'Admirável Bode Novo': regionalismo e ruralismo em defesa da caprinocultura no semiárido nordestino. **Estudos Sociedade e Agricultura**, v. 28, n. 1, p. 109, 1 fev. 2020.

FREITAS, G. D. *et al.* Uso de diferentes métodos no controle do desenvolvimento do Staphylococcus aureus: uma revisão da literatura. **Research, Society and Developmen**t, 21. v. 10, n. 2, p. e40310212546, fev. 2021.

GARCIA, R. V.; TRAVASSOS, A. E. R. Aspectos gerais sobre o leite de cabra: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 81–88, 14 dez. 2011.

GIACINTI, G. *et al.* Prevalence and characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying mecA or mecC and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in dairy sheep farms in central Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 10, p. 7857–7863, 2017.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Veterinary Microbiology**. Editora Blackwell Science. p. 115-117, 1999.

IBGE. **Censo Agropecuário**. Rio de Janeiro:2017. v. 7

KHAZANDI, M.; *et al.* Genomic characterization of coagulase-negative staphylococci including methicillin-resistant Staphylococcus sciuri causing bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 219, p. 17–221 Jun. 2018.

LANGONI, H.; *et al.* Celularidade do leite e Unidades Formadoras de Colônias nas mastites causadas por Staphylococcus coagulase positiva e coagulase negativa. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 518–524 2015.

LANGONI, H.; *et al*. Aspectos etiológicos na mastite bovina: Flora bacteriana aeróbica. **Rev. Bras. Med. Vet**. v. 20, p. 204-209, 1998.

LANGONI, H.; *et al*. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, 2011.

LOBO, R. N. B.; *et al*. Objetivos de produção e critérios de seleção de um programa participativo de base comunitária de melhoramento genético de caprinos e ovinos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Caprinos e Ovinos**, Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 32p.: il. ISSN 0101-6008 2019.

MAIA, M. da S.; *et al.* Sistema de produção de caprino leiteiro para a agricultura familiar. **Circuito de tecnologias adaptadas para a agricultura familiar**, Natal: EMPARN, v.06, n.7, 57p., 2010.

MARTINS, R.P.; *et al*. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT. **Cienc. Anim. Bras**., v. 11, p. 181-187, 2010.

MEDEIROS, E. S.; *et al*. Avaliação in vitro da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de Staphylococcus spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 1, p.71-75, 2009.

MOURA, G.S. DE *et al.* Catarrhal mastitis by staphylococcus simulans in a nulliparous goat. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2018. v. 55, n. 3.

MOURA, G. S. *et al.* Gangrenous mastitis in sheep caused by multidrug-resistant Staphylococcus haemolyticus. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 947–954, 1 dez. 2020.

NETO, L. M. P., *et al.* In vitro efficacy of iodine in the pre and post dipping against coagulase negative staphylococcus isolated in milk of cows with subclinical mastitis. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 4, p. 1–5, 2021.

NEVES, M. C.; *et al*. Detecção de genes da resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos da Staphylococccus spp. **Arq. Inst. Biol**, v. 74, n. 3, p. 2007-2013, 2007.

NORMAND, A. C. *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–17 31 Jan. 2017.

PARK, Y. W. *et al.* Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 88–113, mar. 2007.

PASTERNAK, J. **New methods of microbiological identification using MALDI-TOF**. [S.l: s.n.], 2012.

PATERSON, G. K. Genomic epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus sciuri carrying a SCCmec-mecC hybrid element. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 79 1 Abril 2020.

PEIXOTO, R. de M.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Mastite em pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 754–762, set. 2010.

PYÖRÄLÄ S.; TAPONEN S. Coagulase-negative staphylococci – Emerging mastitis pathogens. **Vet. Microbiol.** v. 134, p. 3-8, 2009.

RAIA JUNIOR, R. B. Influência da mastite na ocorrência de resíduos antimicrobianos no leite. Dissertação (Mestrado em Farmácia), **Universidade de São Paulo**, p. 78, 2001.

RAMALHO, A.C. *et. al.* Eficácia in vitro de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a Staphylococcus spp. isolados em rebanhos leiteiros. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 12, p. 1285-1288, 2012.

ROLLIN, B. Ethics, science, and antimicrobial resistance. **Journal of Agricultural & Environmental Ethics**, v. 14, n. 1, p. 29-37, 2001.

SANTOS, A. D. S. *et al.* Antimicrobial resistance profile of non-aureus Staphylococci isolates from buffalo, goat and sheep mastitis in the Northeast region of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 87, n. 3, p. 290–294, 2020

SANTOS, M. G. O. Monitoramento do leite de cabra processado em mini usinas do Cariri paraibano através do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. Patos/PB, 2005.

Serviço Nacional de Aprendizagem Rural - SENAR. Caprinocultura: criação e manejo de caprinos de leite. **Coleção Senar, n. 266**, Brasília: Senar, 96 p; il. ISBN: 978-65-86344-03-5, 2020.

SILVA, N., *et al*. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água** (5ª ed.). Blucher, 2017.

SPINOSA H.S. Antibióticos: tetraciclinas e cloranfenicol, p.368-371. In: Ibid. (Ed.), **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária.** Guanabara Koogan, São Paulo, 1996.

TAPONEN, S.; *et al*. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 1–13, 2016.

TETZNER, T.A.D. Prevalência de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru na região de Triângulo Mineiro, MG. **Ver. Hig. Alim**., v. 19, n. 130, p. 69-72, 2005.