

USO DO ANTIBIOGRAMA NA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA BACTERIANA EM AMOSTRAS DE LEITE

Laura Francielle Ferreira Borges¹, Carolina Magalhães Caires Carvalho², Samuel Ferreira Gonçalves³, Geziella Aurea Aparecida Damasceno Souza⁴, Ester Dias Xavier⁵, Anna Christina de Almeida⁶.

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias E-mail: lauraborges4@outlook.com

RESUMO – O controle de qualidade do leite é um fator importante para a consolidação da cadeia produtiva. A mastite é o processo inflamatório da glândula mamária que afeta o rebanho leiteiro, ocasionando perda de qualidade do leite. Uma importante forma de controle dessa doença é através da antibioticoterapia. Objetivou-se avaliar a sensibilidade antimicrobiana em amostras de leite coletadas no norte de Minas Gerais. As amostras de leite foram transferidas para Ágar sangue a 5% (v/v) de sangue ovino desfibrinado, logo após incubou-se a 37° C por 24 hrs. Após a incubação, foram observadas as características de crescimento das colônias e realizado testes de sensibilidade antimicrobiana in vitro em técnica de difusão de discos em Agar. A análise estatística foi realizada através do teste Qui-quadrado no software R versão 3.5.0. Observa-se que os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram os antibióticos ampicilina e cefalexina, com frequências de resistência de 62% e 31% respectivamente. A resistência desses antibióticos não está associada com as fazendas analisadas ($p > 0,05$). O conhecimento da resistência bacteriana faz-se necessária, uma vez que a mesma pode vir a tornar-se problema de saúde pública, prejudicando a cadeia produtiva do leite e ao consumidor do leite e seus derivados.

ABSTRACT – Milk quality control is an important factor to consolidate dairy industry. Mastitis is an inflammatory process of the mammary gland that affects dairy herds causing milk losses, such as quality reduction. Antibiotic therapy is one of the most common treatment used to control mastitis milk losses. Objectives of the current study were to evaluate the antimicrobial susceptibility of milk samples collected from dairy herds located in north Minas Gerais state. Milk samples were transferred to 5% sheep blood agar and incubated at 37°C for 24 hours. Bacteria colonies growth was observed after incubation. Antimicrobial susceptibility in vitro tests were carried out using agar diffusion technique. Statistical analyses were conducted using R software version 3.5.0 by Qui-square test. As a result, Ampicillin and Cephalexin have shown more sensibility than others tested antibiotics, 62% and 31% of resistance, respectively. The knowledge about bacterial resistance is important, once it can leads to a serious problems in public health and causes damages to dairy industry and milk products consumers.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é um dos setores mais importantes na agropecuária brasileira o que torna essencial no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população (EMBRAPA, 2016). No Brasil, o controle de qualidade do leite tem sido um princípio importante no fortalecimento da cadeia produtiva, além disso, a produção de leite com qualidade proporciona a segurança alimentar dos consumidores (MANZI, 2011).

A qualidade do leite cru é influenciada por diversos aspectos zootécnicos relacionados à alimentação, ao manejo, potencial genético dos rebanhos e na forma de obtenção, armazenamento e transporte do produto (NERO, 2005). Dessa forma o uso de boas práticas de educação sanitária nas instalações também é indispensável para que os produtores compreendam os benefícios econômicos produzidos com a obtenção de leite com qualidade (MANZI, 2011).

A mastite é caracterizada como processo inflamatório da glândula mamária, considerada como principal doença que afeta a pecuária leiteira, prejudicando diretamente a produção do rebanho. De acordo com Costa et al. (2001), os prejuízos ocasionados são notáveis e variam de acordo com intensidade da infecção, o predomínio da doença no rebanho, a patogenicidade dos agentes envolvidos e o estado de lactação.

A mastite em qualquer intensidade ou forma ocasiona prejuízos econômicos aos produtores, reduzindo a produção e perda de qualidade, provocando alterações na composição do leite, transformando-o em inadequado para a indústria e consumo (COSTA et al., 2001). De acordo com Machado, Pereira e Sarrís (2000) a mastite altera a composição do leite, por transformar a permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula e alterar a habilidade de síntese do tecido secretor e pela ação direta dos patógenos ou de enzimas sobre os elementos já secretados no interior da glândula.

A aplicação de antibióticos no controle de infecções intramamárias e na eliminação de possíveis fontes de infecção nas fazendas leiteira constitui uma importante medida de controle para a mastite. Entretanto, o uso inadequado dos antibióticos no tratamento pode proporcionar o surgimento de cepas resistentes comprometendo a eficiência do tratamento (MENDONÇA et al., 2012).

Objetivou-se no presente estudo avaliar a sensibilidade antimicrobiana em amostras de leite coletados no norte de Minas Gerais.

MATERIAS E MÉTODOS

Durante a pesquisa, foram utilizados 50 amostras de leite provenientes de seis propriedades da região do Norte de Minas.

Para a realização da coleta de leite, foi feita a higienização do úbere com água e sabão, secagem com papel toalha e anti-sepsia dos tetos com álcool a 70° GL. As amostras foram coletadas dos quartos mamários com mastite subclínica diagnosticada através do teste California Mastitis Test (CMT) (SCHALM & NOORLANDER, 1957). Foram colhidos aproximadamente 5 mL de leite, em frascos com tampa rosqueadas, estéreis e previamente identificados com o nome ou número do animal, sendo enviadas em caixas isotérmicas com gelo ao Laboratório de Sanidade Animal localizado no Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias da UFMG (CPCA – ICA/UFMG), para serem analisadas.

As amostras foram transferidas com a alça de inoculação em placas contendo Ágar sangue, acrescido de 5% (v/v) de sangue ovino desfibrinado. As placas foram incubadas a 37°

C por 24 hrs. Após a incubação, foram observadas as características de crescimento das colônias na placa, como produção de hemólise, pigmentos e características morfo-tintoriais utilizando o método de coloração pela técnica de Gram. As bactérias identificadas como gram positivas foram semeadas em placas de TSA e as bactérias identificadas com gram negativas foram passadas para as placas de Mac Conkey (CLSI, 2015).

Para a identificação de *S. aureus* todas as cepas de *estafilococos* foram submetidas aos testes de produção de coagulase livre (Plasma Coagulase EDTA), segundo SILVA et al. (1997).

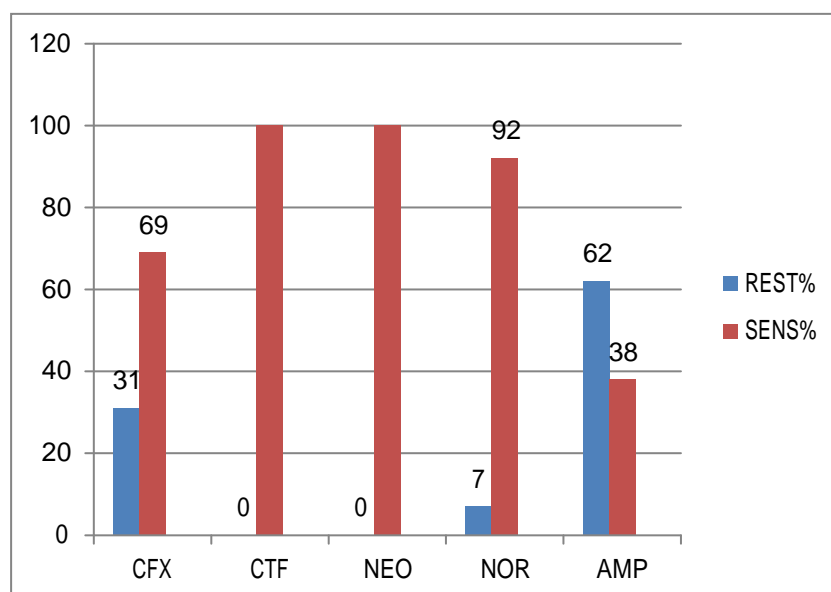
Os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados de *S. aureus* e outros estafilococos coagulase positivos foram realizados utilizando a técnica de difusão de discos em Ágar *Müller Hinton* segundo CLSI, (2015). Para este teste foram selecionados 13 amostras de leite, provenientes de seis fazendas analisadas. Foram utilizados os discos impregnados de antibióticos: cefalexina (CFX), ceftiofur (CTF), neomicina (NEO), norfloxacina (NOR) e ampicilina (AMP).

Os resultados foram submetidos à estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados microbiológicos. Para verificar se houve associação entre as fazendas avaliadas e a resistência dos antimicrobianos realizou-se o teste Qui-Quadrado pelo software R versão 3.5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

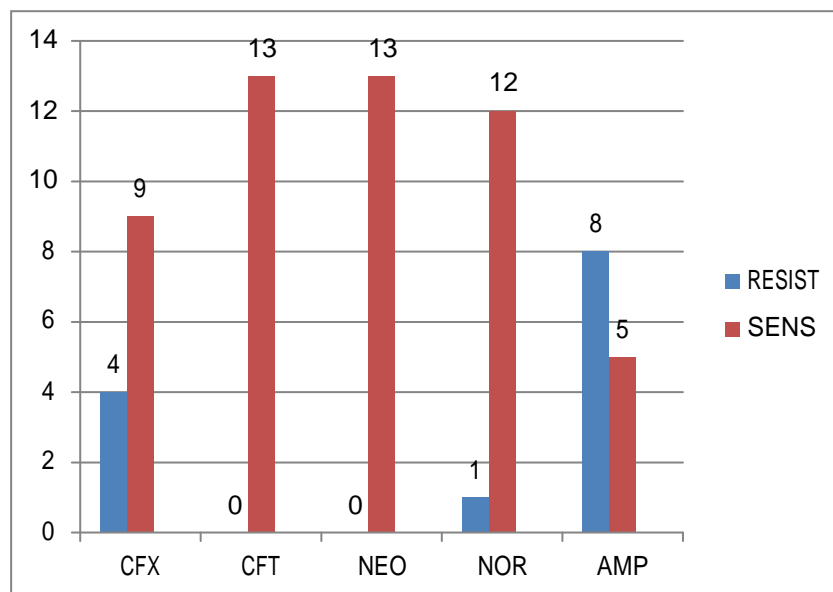
Os resultados são encontrados nas figuras 1 e 2. Não foi observada resistência para ceftiofur (CFT) e neomicina (NEO). A ampicilina (AMP) apresentou resistência elevada (62%) entre os antibióticos analisados, seguido da cefalexina (31%). Esses resultados demonstram o uso indiscriminado desses medicamentos, uma vez que o uso de antibióticos sem a prescrição correta acarreta na seleção de microrganismos resistentes a antibióticos, o qual torna ineficaz o tratamento de infecções e conseqüentemente reinfecção, pois o medicamento passa a ser ineficaz frente aos agentes patogênicos causadores da doença (SANTOS, 2004).

Figura 1. Frequência de resistência e sensibilidade relativa entre os antibióticos.



CFX: Cefalexina; CFT: Ceftiofur; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacina; AMP: Ampicilina

Figura 2. Resistência e sensibilidade absoluta entre os antibióticos.



CFX: Cefalexina; CFT: Ceftiofur; NEO: Neomicina; NOR: Norfloxacin;
AMP: Ampicilina

Os resultados da tabela 1 demonstram que não houve associação ($p > 0,05$) entre as fazendas analisadas e a frequência de resistência dos antibióticos. Isso demonstra que a Ampicilina e a Cefalexina teve um perfil de resistência semelhante entre as fazendas. Resultados semelhantes foram encontrados por Cardoso et al. (2000), onde foi verificada alta suscetibilidade in vitro dos isolados à cefotaxima (100%), enrofloxacin (98,4%), gentamicina (98,4%), cloranfenicol (90,4%), sulfazotrim (86,6%) e novobiocina (85,8%), assim como elevada taxa de resistência para polimixina B (91,3%), ampicilina (71,4%) e penicilina G (70,9%).

Tabela 1. Frequência de resistência da Ampicilina e Cefalexina das fazendas avaliadas.

Fazendas	Frequência de resistência da Ampicilina	Frequência de resistência da Cefalexina
FAZ.1	2	1
FAZ.2	2	1
FAZ.3	2	0
FAZ.4	1	0
FAZ.5	1	1
FAZ.6	0	1
p-valor	0,7765	0,8491

O mecanismo de resistência bacteriana a penicilina e outros beta-lactâmicos foi descrito na década de 1960, pelo gênero de microrganismos *Staphylococcus aureus*, tal mecanismo consiste de origem genética na qual os genes cromossômicos possuem a capacidade de codificar o receptor do beta-lactâmicos e alterando o mecanismo de ação (TAVARES, 2000). Com isto, surgem as proteínas ligantes de penicilina – PBP's, que possuem baixa afinidade a antibióticos, proporcionando ambiente favorável ao microrganismo a tornar-se resistente a medicamentos.

Um dos principais problemas é a resistência bacteriana, o que pode tornar um problema de saúde pública, causando problemas por intoxicação alimentar ao ingerir alimentos como o leite e seus derivados. A contaminação ocorre pela liberação de toxinas termoestáveis, que em muitos casos o microrganismo sobrevive ao processo de cozimento (STAMFORD et al., 2006). De acordo com os resultados encontrados, há necessidade de monitorar com frequência o perfil de suscetibilidade dos diferentes microrganismos envolvidos na mastite bovina, visando acompanhar a evolução dos índices de resistência para a escolha das drogas mais adequadas a serem utilizadas além de um manejo adequado durante a coleta do leite.

CONCLUSÃO

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram resistência aos antibióticos Ampicilina e Cefalexina. Os antibióticos que apresentaram resistência, não foram observados associação com as fazendas analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLSI. M100-S22: **Padrões de desempenho para testes de susceptibilidade antimicrobiana**. Vigésimo segundo suplemento informativo - M100S22E.

CARDOSO, H. F. T.; COSTA, G.M.; SILVA, N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 22, n. 5, p. 199-206, 2000. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/277114209_Susceptibilidade_antimicrobiana_de_Staphylococcus_aureus_isolados_de_amostras_de_leite_de_bovinos_com_suspeita_de_mastite. Acesso em: 20 jul. 2018.

COSTA E. O.; GARINO F.; WATANABE E. T.; SILVA J. A. B.; RIBEIRO A. R.; HORIUTI A. M. Patógenos de mastite bovina isolados de glândulas mamárias negativas aos testes de Tamis e CMT. **Revista do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Glândula Mamária e Leiteira - NAPGAMA**, v. 4, p. 12-15, 2001.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Gado do Leite – Importância Econômica**.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, G. A. Composição do Leite de Tanques de Rebanhos Brasileiros Distribuídos Segundo sua Contagem de Células Somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 1883-1886, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/%0D/rbz/v29n6/5721.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2018.

MANZI, M. P. **Monitoramento da Qualidade do leite: Procedimentos Diagnósticos**. 2011. 21 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Júlio Mesquita Filho, Botuacu, 2011.

MENDONÇA, E. C. L.; MARQUES, V. F.; MELO, T. A. A.; COELHO, I. S.; COELHO, S. M. O.; SOUSA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência antimicrobiana em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 859-864, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900008. Acesso em: 20 jul. 2018.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras

brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 1, p. 191-195, jan./mar. 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612005000100031&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 20 jul. 2018.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto contexto - Enfermagem**, v. 13, n. spe, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010407072004000500007&script=sci_abstract&tlng. Acesso em: 20 jul. 2018.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **J. American Veterinary Medical Association**. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=2071511&pid=S1413959620010001001000011&lng=en Acesso em: 20 jul. 2018.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, p. 295. 1997.