

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS DOIS VIZINHOS
CURSO DE BACHARELADO EM ZOOTECNIA

TAÍS SILVA DE AVILA

**ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE MASTITE BOVINA EM DOIS
VIZINHOS-PR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

DOIS VIZINHOS
2021

TAÍS SILVA DE AVILA

**ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE
Staphylococcus aureus ISOLADAS DE MASTITE BOVINA EM DOIS
VIZINHOS-PR**

**ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTS OF *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* STRAINS ISOLATED FROM BOVINE MASTITIS IN DOIS
VIZINHOS - PR.**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentada como requisito para obtenção do título
de Bacharel em Zootecnia da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Profa. Dra. Marcela Tostes Frata

Coorientador: Fábio Antônio Antonelo

DOIS VIZINHOS
2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Dois Vizinhos
Curso de Zootecnia



FOLHA DE APROVAÇÃO TCC

ENSAIOS DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS DE MASTITE BOVINA EM DOIS VIZINHOS-PR

Autor: Taís Silva de Avila

Orientador: Profª. Dra. Marcela Tostes Frata

Coorientador: Fábio Antônio Antonelo

TITULAÇÃO: Zootecnista

APROVADA em 25 de agosto de 2021.

Dr. Juliano Zanela

Prof. Dr. Francisco Menino Destéfanis
Vítola

Profª. Dra. Marcela Tostes Frata
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e ao meu companheiro Daniel Stanger por toda ajuda, apoio, carinho e incentivo para a realização desse trabalho.

À UTFR Campus Dois Vizinhos, essencial no meu processo de formação profissional, à minha orientadora Profa. Dra. Marcela Tostes Frata por ter aceitado e dedicado seu tempo na execução do mesmo e por todos seus ensinamentos passados. Ao meu coorientador Fábio Antônio Antonelo pela amizade, disponibilidade e suporte essencial na realização deste trabalho.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

RESUMO

AVILA, Taís Silva de. **Ensaio de susceptibilidade a antibióticos de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina em Dois Vizinhos - PR.** 2021. 40 p. Trabalho (Conclusão de Curso) – Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

A bovinocultura leiteira é uma atividade agropecuária com grande importância econômica para o Brasil, sendo a mastite bovina uma das principais doenças acometidas em rebanhos leiteiros. Atualmente, a principal forma de tratamento é a utilização de antibióticos, porém, devido ao uso indiscriminado desses produtos, algumas cepas bacterianas causadoras desta doença adquirem resistência, trazendo assim, prejuízos em todas as fases da cadeia produtiva do leite. Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de susceptibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de bovinos com mastite frente a diferentes antibióticos. Foram visitadas quatro propriedades localizadas no município de Dois Vizinhos, PR, onde se realizaram testes para identificação de mastite clínica e subclínica nos animais em lactação e coletadas informações sobre as características do rebanho e da propriedade. Amostras de leite mastítico (positivos para o teste de caneco de fundo preto e CMT) foram coletadas, semeadas e testadas para a identificação de *S. aureus*. As cepas positivas foram submetidas ao antibiograma utilizando-se os seguintes antibióticos: Amoxicilina (10 µg), Cefotiofur (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Estreptomicina (100 µg), Penicilina/Novobiocina (10 UI/30 µg), Sulfazotrim (300 µg). A resistência das cepas foi analisada através da avaliação dos halos de inibição pelo método de Kirby-Bauer (disco-difusão). Foram coletadas 50 amostras de leite de animais que testaram positivo aos testes para mastite, sendo que destas, 34 cepas isoladas testaram positivo para *S. aureus*. De forma geral, a maioria das cepas foram sensíveis aos antibióticos, sendo no entanto, evidenciada resistência bacteriana para Enrofloxacin, Sulfazotrim e especialmente para a Estreptomicina. Uma das propriedades demonstrou os melhores resultados, não sendo evidenciadas cepas resistentes, o que indica o correto uso dos agentes antimicrobianos. Adicionalmente, realizou-se o teste utilizando o óleo essencial de cravo-da-índia, o qual demonstrou potencial antimicrobiano contra todas as cepas testadas, incluindo àquelas resistentes aos antibióticos, possivelmente pela ação do eugenol, cariofileno e humuleno, seus compostos bioativos majoritários. Ademais, o óleo essencial testado revelou atividade antimicrobiana, sendo necessários estudos mais aprofundados no que diz respeito ao potencial uso do mesmo como agente alternativo no controle de mastite bovina.

Palavras-chave: Antibiograma. Bovinocultura leiteira. Isolamento. Óleo essencial.

ABSTRACT

AVILA, Taís Silva de. **Antibiotic susceptibility tests of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in Dois Vizinhos - PR.** 2021. 40 p. Trabalho (Conclusão de Curso) – Graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Dois Vizinhos, 2021.

Dairy cattle farming is an agricultural activity with great economic importance for Brazil, and bovine mastitis is one of the main diseases affecting dairy herds. Currently, the main form of treatment is the use of antibiotics, but due to the indiscriminate use of these products, some bacterial strains that cause this disease acquire resistance, thus causing losses in all phases of the dairy supply chain. Therefore, the aim of this study was to evaluate the susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cattle with mastitis against different antibiotics. Four properties located in Dois Vizinhos, PR, were visited, tests were performed to identify clinical and subclinical mastitis in lactating animals and information on herd and property characteristics was collected. Mastitic milk samples (positive for the black-bottom mug test and CMT) were collected, inoculated, and tested for the identification of *S. aureus*. The positive strains were submitted to antibiogram using the following antibiotics: Amoxicillin (10 µg), Ceftiofur (30 µg), Enrofloxacin (5 µg), Streptomycin (100 µg), Penicillin/Novobiocin (10 IU/30 µg), Sulfazotrim (300 µg). Resistance of the strains was analyzed by evaluating the inhibition halos by the Kirby-Bauer method (disc-diffusion). Fifty milk samples were collected from animals that tested positive to tests for mastitis, and of these, 34 isolated strains tested positive for *S. aureus*. In general, most strains were sensitive to antibiotics, but bacterial resistance was evident for Enrofloxacin, Sulfazotrim and especially Streptomycin. A property demonstrated the best results, with no evidence of resistant strains, indicating the correct use of antimicrobial agents. Additionally, test was performed using the essential oil of clove, which showed antimicrobial potential against all strains tested, including those resistant to antibiotics, possibly by the action of eugenol, caryophyllene and humulene, its major bioactive compounds. Furthermore, the tested essential oil showed antimicrobial activity, requiring further studies regarding its potential use as an alternative agent in the control of bovine mastitis.

Keywords: Antibiogram. Bovine dairy farming. Isolation. Essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Glândula mamária evidenciando a região glandular	15
Figura 2 – Cultura em Ágar Vogel-Jhonson com crescimento de colônias de <i>S. aureus</i> (A2, B1 e B2).....	22
Figura 3 – Representação do teste de susceptibilidade evidenciando o halo de inibição.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros para avaliação da qualidade do leite baseado nas IN 76 e 77/2018 do MAPA.....	17
Tabela 2 – Comparativos de Incidências de mastite nas propriedades estudadas.	25
Tabela 3 – Parâmetros utilizados para a interpretação das medidas dos halos de inibição.....	26
Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas na Propriedade A	27
Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas na Propriedade B.....	28
Tabela 6 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas na Propriedade C.....	29
Tabela 7 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de <i>S. aureus</i> isoladas na Propriedade D.....	30
Tabela 8 – Perfil de susceptibilidade e atividade antimicrobiana do OE de cravo-da-índia das cepas de <i>S. aureus</i> resistentes.....	31
Tabela 9 – Composição química do óleo essencial de cravo-da-índia.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
2.1. OBJETIVO GERAL	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 MASTITE.....	14
3.1.1 Mastite Clínica e Subclínica.....	15
3.1.2 Mastite Ambiental e Contagiosa	15
3.2 QUALIDADE DO LEITE	17
3.3 TRATAMENTO DA MASTITE	18
3.4 PREVENÇÃO DA MASTITE.....	19
3.5 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 TESTES DE MASTITE	21
4.2 PERFIL DAS PROPRIEDADES.....	21
4.3 COLETA DE AMOSTRAS	21
4.4 ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS	22
4.4.1 Teste de coagulase.....	22
4.5 TESTE DE ANTIBIOGRAMA	23
4.6 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA.....	24
4.6.1 Avaliação da composição química do OE de cravo-da-índia	24
4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1. PERFIL DAS PROPRIEDADES E INCIDÊNCIA DE MASTITE	25
5.2. ISOLAMENTO DE CEPAS DE <i>S. aureus</i>	26
5.3. PERFIL DE SUCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS A ANTIBIÓTICOS	26
5.3.1. Propriedade A	26
5.3.2. Propriedade B	28
5.3.3. Propriedade C	29

5.3.4. Propriedade D.....	30
5.3.5. Conclusões sobre o perfil de susceptibilidade.....	30
5.4. CONTROLE ALTERNATIVO DE <i>S. aureus</i> COM O ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA	31
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

O leite é um alimento rico em vitaminas e cálcio sendo produzido em todo o mundo e de grande importância na alimentação humana, pois possui destaque na agricultura familiar, sendo considerado uma fonte de renda de retorno rápido (MATTE JÚNIOR; JUNG, 2017).

O Brasil está entre um dos principais produtores do mundo progredindo gradativamente nas últimas décadas, sendo que de 1974 a 2014 a produção subiu de 7,1 bilhões para 35,1 bilhões litros de leite, no ano de 2015 a produção teve uma queda devido à crise econômica enfrentada pelo país. No ano de 2019 a produção de leite somou 34,8 bilhões de litro, com uma alta de 2,7% comparado a ano de 2018 (ANUARIO LEITE, 2020).

A produção leiteira no Estado do Paraná apresentou aumento notável no ano 2009, saindo de 1.725 milhões de litros/leite no ano de 1999 para 3.339 milhões de litros, com taxas de crescimento em torno de 6,8% superior à média nacional (BAPTISTA; SUGAMOSTO; WAVRUK, 2011). Em 2018, o Paraná apresentou grande crescimento na cadeia produtiva do leite estando em segundo lugar no ranking brasileiro com uma produção com 4.375.422 litros, estando apenas atrás do estado de Minas Gerais, com produção de 8.939.159 litros (IBGE, 2018). Destacam-se no Paraná três regiões produtoras de leite, sendo elas: Centro-oriental, Oeste e Sudoeste com 53% da produção estadual (BAPTISTA; SUGAMOSTO; WAVRUK, 2011).

O Sudoeste do Paraná se destaca por ser uma das principais bacias leiteiras do Estado, com produção de 904,74 milhões de litros de leite no ano de 2011, estando acima da média encontrada no Estado (SILVA; CAMARA; TELLLES, 2016; IBGE, 2020).

Mesmo com a alta produção de leite em todo território nacional, ainda se enfrentam problemas que dificultam o crescimento da produção, principalmente os relacionados à qualidade do leite produzido, sendo que a doença mais conhecida neste sentido é a mastite bovina.

A mastite manifesta-se na forma clínica e subclínica e os modos para diferenciação das mesmas se dá pelos sintomas apresentados. A mastite clínica apresenta alterações visíveis no leite e úbere conforme seu grau de infecção podendo estar inchado, sensível, com vermelhidão e consistência endurecida na área afetada, já na subclínica os sintomas não são visíveis, dificultando assim a identificação na forma visual, sendo necessário a realização de testes específicos para o diagnóstico, como o mais conhecido *California Mastitis Test* (CMT), cujo

reagente destrói os glóbulos brancos (leucócitos) existentes no leite e coagula sua proteína, sendo o resultado verificado pelo grau de coagulação e de coloração (VEIGA, 1998).

A mastite é uma das principais doenças que acomete rebanhos leiteiros, causando grandes prejuízos econômicos tanto ao produtor, quanto à indústria (TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008). Estima-se que o prejuízo seja em torno de 2,4 bilhões de litro de leite/ano, o mesmo se dá também devido à falta de assistência técnica de qualidade aos produtores, bem como ao seu conhecimento insuficiente para a realização do tratamento correto (CARVALHO; BEURON; SANTOS, 2012).

O *Staphylococcus aureus* é a principal bactéria causadora da mastite, que é uma patologia inflamatória que atinge a glândula mamária das vacas. Caracterizado como um coco Gram-positivo esférico com formação de aglomerados irregulares semelhantes a cachos de uva, apresenta catalase e coagulase positiva, sendo também um agente piogênico (SIMÕES et al., 2013).

O tratamento é efetuado com antibióticos, todavia, devido à grande procura dos produtores da região por esses medicamentos, por vezes, as cepas causadoras desta doença adquirem resistência, devido à escolha ou utilização inadequada do produto durante o tratamento.

Uma forma para o tratamento e controle da mastite pode vir a se tornar a utilização de produtos naturais, pois cada vez mais vem sendo utilizadas plantas medicinais neste meio, visando diminuir os prejuízos trazidos pelo uso incorreto e em excesso de antimicrobianos que causa a resistência dos microrganismos (COSTA et al., 2009).

Um antimicrobiano conhecido entre os produtos naturais é o óleo essencial (OE) de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), conhecido popularmente como cravo-da-índia (COSTA JÚNIOR et al., 2019; RADÜNZ et al., 2019).

Atualmente, inúmeros trabalhos vêm demonstrando os prejuízos causados por esta bactéria e seu controle acabou virando foco na bovinocultura leiteira (DEMEU et al., 2011; DEMEU et al., 2015; ANDRADE, 2018).

Neste sentido, a realização de ensaios laboratoriais de susceptibilidade a antibióticos de cepas bacterianas isoladas de animais com sintomas de mastite clínica e/ou subclínica é de suma importância para o correto e eficaz tratamento no controle de patógenos, resultando no aumento da produtividade e da qualidade do leite produzido (MEDEIROS et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a susceptibilidade de cepas de *S. aureus*, isoladas de bovinos com mastite, frente a diferentes antibióticos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar os protocolos de diagnóstico de mastite clínica e subclínica nos rebanhos leiteiros de quatro propriedades do município de Dois Vizinhos, Paraná;
- Isolar cepas da bactéria *S. aureus* de amostras de leite dos animais com suspeita de infecção;
- Realizar testes de susceptibilidade a antibióticos;
- Colher informações sobre o perfil das propriedades estudadas;
- Avaliar a incidência de mastite clínica e subclínica em bovinos lactantes e a ocorrência de cepas de *S. aureus* resistentes nas propriedades selecionadas;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial (OE) de cravo-da-índia sobre as cepas resistentes isoladas;
- Caracterizar a composição química do OE de cravo-da-índia.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O leite é um alimento rico em nutrientes como vitaminas, minerais e proteínas, sendo um item de grande importância na alimentação humana, caracterizando-se como a principal fonte de cálcio disponível (BEDANI; ROSSI, 2005; FAGAN et al., 2008)

No Brasil, a bovinocultura leiteira é uma atividade de grande relevância no setor agropecuário. Atingindo uma produção do primeiro ao segundo trimestre em torno de 5,85 milhões de litros de leite (IBGE, 2019).

Em contrapartida, doenças como a mastite podem acometer os animais em lactação, comprometendo a qualidade do leite produzido, impactando a saúde pública e gerando perdas econômicas ao produtor e à indústria (TOZZETTI; BATAIER; ALMEIDA, 2008; RAMOS et al., 2017).

3.1 MASTITE

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, ocasionada por agentes infecciosos, químicos, mecânicos ou térmicos. Dentre os agentes infecciosos encontra-se o *S. aureus*, um dos principais causadores da mastite bovina (MENDONÇA et al., 1999; (DE FREITAS et al., 2005)

Quando a mesma se instala na região glandular (Figura 1), fixa-se sob as células epiteliais, libera toxinas, gerando a infecção, que seguidamente necrosa o estroma e o parênquima mamário, resultando na perda efetiva da função e secreção do leite e, conseqüentemente, interferindo negativamente na qualidade e produtividade, determinando perdas elevadas por descarte do leite, gastos com medicamentos, perda funcional da glândula e até a morte ou necessidade de abate do animal (FONSECA; SANTOS, 2000).

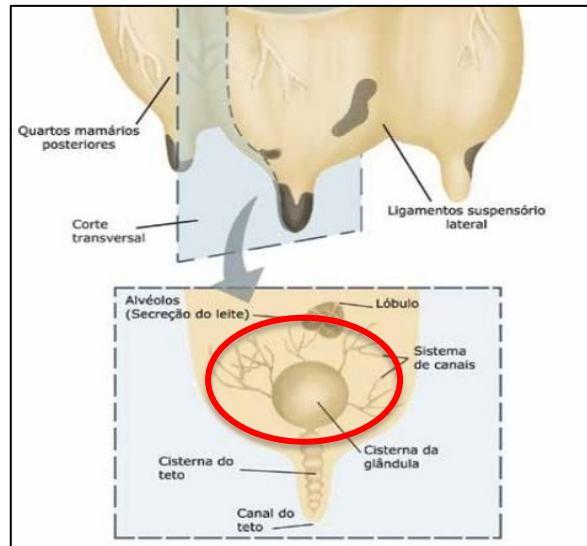


Figura 1 – Glândula mamária evidenciando a região glandular

Fonte: Tunes, 2009.

Ademais, a mastite pode ser classificada de acordo com as suas formas de manifestação (mastite clínica e subclínica) e com a forma de contágio (mastite ambiental e contagiosa), sendo de extrema importância a avaliação desses parâmetros frente ao tratamento.

3.1.1 Mastite Clínica e Subclínica

A mastite clínica se caracteriza por apresentar secreção purulenta, grumos, dor, endurecimento das glândulas mamárias e o aumento da temperatura, sendo o diagnóstico realizado através do teste do caneco de fundo preto (RIBEIRO et al., 2003).

Já a mastite subclínica ocorre no tecido conjuntivo da glândula mamária trazendo prejuízos ao produtor, dentre estes o mais evidente é a queda na produção leiteira, não apresentando alterações visuais no leite produzido (COSTA, 1998). A mastite subclínica, por sua vez, pode ser diagnosticada pelo CMT (BRITO et al., 1997)

De acordo com Zschöck et al. (2000), os microrganismos de aspecto contagioso são responsáveis pela maior frequência de casos de mastite tanto clínica, quanto subclínica, destacando-se o gênero *Staphylococcus*.

3.1.2 Mastite Ambiental e Contagiosa

Os microrganismos causadores da mastite bovina são classificados de acordo com a sua epidemiologia em contagiosos e ambientais (MENDONÇA et al., 1999). A mastite contagiosa

é transmitida de animal para animal, com localização intramamária, sendo o animal contaminado a própria fonte de disseminação (PEDRINI; MARGATHO, 2003). Dentre os principais causadores de mastite contagiosa está o *S. aureus*, destacando-se por possuir maior frequência tanto em casos clínicos, quanto subclínicos, sendo a espécie de maior relevância para a indústria de lácteos (ZSCHÖCK et al., 2000).

De acordo com Fonseca e Santos (2001), além do *S. aureus*, o *Streptococcus agalactiae* e o *Corynebacterium bovis* também são microrganismos causadores da mastite contagiosa, cujas características estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Características gerais de microrganismos causadores de mastite contagiosa

MASTITE CONTAGIOSA			
PATÓGENO	FONTE USUAL	DISSEMINAÇÃO	CONTROLE
<i>S. agalactiae</i>	Úberes infectados, (interior da glândula mamária)	Vaca-vaca durante a ordenha; superfícies contaminadas com leite, mãos dos ordenhadores.	Pré e pós- <i>dipping</i> , tratamento da vaca seca e de novilhas, tratamento na lactação; enfatizar papel do ordenhador.
<i>S. aureus</i>	Canal do teto, interior da glândula mamária, pele do teto, principalmente quando lesada.	Vaca-vaca durante a ordenha; fômites: mãos do ordenhador, panos e esponjas de uso múltiplo.	Pré e pós- <i>dipping</i> , tratamento da vaca seca, limitar a disseminação vaca-vaca, redução do nº de vacas infectadas.
<i>C. bovis</i>	Interior da glândula mamária e ductos do teto.	No momento da ordenha; deficiência na desinfecção dos tetos após ordenha.	Pré e pós- <i>dipping</i> e maiores cuidados no pós- <i>dipping</i> ; enfatizar papel do ordenhador.

Fonte: Adaptado de Fonseca e Santos (2001).

Durante a mastite contagiosa, o *S. aureus* provém de animais infectados, mas especificadamente dos canais dos tetos, interior da glândula mamária ou pele do teto (principalmente quando lesada). As fontes de disseminação desse mesmo tipo de mastite podem ocorrer durante a ordenha mecânica ou manual, com uso inapropriado de materiais para higienização na pré-ordenha (*pré-dipping*). Dentre os principais métodos de controle estão a realização de pré e pós-ordenha (*pós-dipping*).

Já a mastite ambiental é uma forma de infecção provocada por microrganismos vindos do ambiente onde os animais permanecem (SILVA et al., 2010).

Dentre os principais agentes causadores da mastite ambiental estão: *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.* e *Streptococcus uberis* (Quadro 2).

Quadro 2 – Características gerais de microrganismos causadores de mastite ambiental

MASTITE AMBIENTAL			
PATÓGENO	FONTE USUAL	DISSEMINAÇÃO	CONTROLE
<i>E. coli.</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Enterobacter sp.</i> , <i>Streptococcus uberis</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>Serratia sp.</i>	Ambiente	Ambiente – vaca (principalmente durante o período entre ordenhas)	Redução da exposição das extremidades dos tetos aos patógenos do ambiente; aumento da resistência imunológica da vaca

Fonte: Adaptado de Fonseca e Santos (2001).

Nesse tipo de mastite a principal fonte de microrganismos patogênicos advém do ambiente, sendo que a contaminação dos animais não ocorre durante a ordenha, mas sim no período entre ordenhas. Ainda, a diminuição do contato dos tetos com o ambiente se caracteriza como uma medida profilática em relação ao desenvolvimento de mastite contagiosa.

3.2 QUALIDADE DO LEITE

A legislação brasileira possui normas específicas frente aos parâmetros a serem analisados para a determinação da qualidade do leite. As Instruções Normativas nº 76 e 77 de 26 de novembro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) dispõem sobre alguns parâmetros a serem considerados na avaliação da qualidade do leite cru refrigerado produzido nas propriedades rurais (Tabela 1).

Tabela 1 – Parâmetros para avaliação da qualidade do leite baseado nas IN 76 e 77/2018 do MAPA

Parâmetro	IN nº 76 e 77/2018
Teor mínimo de gordura (g/100g)	3,0
Teor mínimo de proteína total (g/100g)	2,9
Teor mínimo de lactose anidra (g/100g)	4,3
Teor mínimo de sólidos não gordurosos (g/100g)	8,4
Acidez titulável (g ácido láctico/100 mL)	0,14 - 0,18
Densidade relativa a 15 °C	1,028 - 1,034
Contagem Padrão em Placas (UFC/mL)	3,0x10 ⁵
Contagem de Células Somáticas (CS/mL)	5,0x10 ⁵

Fonte: IN nº 76 e 77 (2018).

Dentre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos para avaliação da qualidade do leite estão os teores de gordura, proteína total, lactose, sólidos não gordurosos, bem como a acidez titulável, densidade relativa, Contagem Padrão em Placas (CPP) e Contagem de Células Somáticas (CCS) (Tabela 1).

Por sua vez, a qualidade do leite é comprometida quando o animal lactante apresenta um quadro de mastite. Segundo Tozzetti, Bataier e Almeida (2008), a mastite clínica apresenta sinais evidentes: aparecimento de grumos, pus ou outras alterações na qualidade do leite. Já a mastite subclínica, apresenta sinais como o aumento na CCS, diminuição do percentual de caseína, gordura, sólidos totais e lactose do leite.

Nesse sentido, é de extrema importância realizar a identificação e controle das diferentes formas de mastite nos rebanhos leiteiros, visto que a qualidade do leite pode ser diretamente influenciada pela sanidade dos animais.

3.3 TRATAMENTO DA MASTITE

O tratamento da mastite deve ser preconizado quando forem constatadas alterações visuais no leite, o que indica infecção clínica (LANGONI et al., 2017). Atualmente, a alternativa mais utilizada para essa finalidade é o uso de antimicrobianos, os quais devem ser selecionados de acordo com o tipo de agente causador da infecção.

No entanto, a facilidade de acesso aos medicamentos têm resultado na escolha errônea dos antibióticos utilizados, o que acaba contribuindo para a seleção de cepas resistentes, as quais interferem na eficiência do tratamento (COSTA, 2010).

Dentre os patógenos causadores da mastite, os do gênero *Staphylococcus* têm sido os microrganismos mais estudados em relação à resistência antimicrobiana (SOUZA et al., 2016). Isso ocorre devido à ação prolongada desses patógenos sobre o hospedeiro, o que torna difícil a realização do controle da mastite.

Souza et al. (2016), ao realizarem estudos de susceptibilidade ao *Staphylococcus* spp., constataram que os maiores índices de resistência foram observados para a Penicilina G (73,08%) e os maiores índices de sensibilidade foram observados para gentamicina (96,15%).

Outro estudo desenvolvido por Nádía et al., (2012) demonstrou que dentre os antibióticos testados, novamente a penicilina apresentou os maiores índices de resistência para *S. aureus* (46,15%) e Ciprofloxacina, Sulfazotrim e Vancomicina apresentaram os maiores percentuais de sensibilidade (97,44, 97,44 e 94,87%, respectivamente).

Nesse sentido, a realização de ensaios de susceptibilidade é de considerável importância para a determinação do antibiótico a ser utilizado a fim de serem alcançados os melhores resultados para o tratamento da mastite.

No entanto, medidas preventivas podem ser implantadas contra a mastite, buscando assim a prevenção dessa doença nos rebanhos, diminuindo prejuízos.

3.4 PREVENÇÃO DA MASTITE

Com o intuito de diminuir a incidência de mastite bovina nas propriedades leiteiras, busca-se a realização de práticas de prevenção e atenuação da mastite. Para isso, MÜLLER (2002) apresenta a utilização de programas de prevenção e controle da mastite, sendo que:

“Os programas de prevenção e controle da mastite têm por objetivo limitar a prevalência das infecções e por consequência diminuir os impactos econômicos na atividade leiteira. Um bom programa de controle deve ter como metas principais, erradicar as mastites contagiosas por *Streptococcus agalactiae*, controlar as por *Staphylococcus aureus*, manter baixos os índices de mastites ambientais, contagens de células somáticas abaixo de 200.000/mL/leite, menos de 2% de episódios clínicos ao mês e 85% das vacas livres de mastite subclínica. Para alcançar estas metas é necessário atuar sobre a fonte de infecção, detectando corretamente as vacas com mastite clínica e subclínica, tratando-as corretamente, eliminar os animais com infecções crônicas.”

O uso de mão-de-obra qualificada que possua conhecimento dos procedimentos corretos a serem utilizados no momento da ordenha agregará valor ao produto final.

Sabe-se também que o correto manejo no momento da ordenha, como a limpeza correta dos tetos e dos equipamentos utilizados, irá reduzir o número de animais infectados com a mastite bovina, assim proporcionando a melhora na qualidade do leite (SCHVARZ; DOS SANTOS, 2012).

De acordo com Müller (2002), a ordenha deve ser realizada por pessoas com experiência, seguindo rotinas pré-estabelecidas como a execução do teste da caneca de fundo

preto e métodos de higienização adequados e, em seguida, a limpeza dos tetos com água e posterior imersão dos mesmos em solução antisséptica por 30 segundos (*pré-dipping*).

Em seguida, se faz a secagem com papel toalha descartável, sendo indicado uma folha para cada teto e ao término da ordenha, deve-se fazer imersão novamente em solução antisséptica (*pós-dipping*), desse modo, ao realizar estes procedimentos antes e após a ordenha, se tem a redução de 50 a 85% do índice de novas infecções. A higienização da ordenhadeira deve ser feita com enxágue em água de 32 a 41°C, enxágue com água e detergente alcalino clorado (71 a 74°C) e por último usa-se o detergente ácido e após enxague com água em temperatura ambiente.

3.5 ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Um método alternativo para o controle da mastite bovina pode ser a utilização de produtos naturais. Um antimicrobiano conhecido é o óleo essencial (OE) de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), conhecido popularmente como cravo-da-índia (COSTA JÚNIOR et al., 2019; RADÜNZ et al., 2019).

OEs são misturas líquidas formadas por substâncias orgânicas, voláteis e aromáticas como compostos terpênicos e fenilpropanoides, apresentando inúmeras aplicações, indo desde a preservação de alimentos e aromaterapia, até utilizações como antimicrobianos naturais (CSIKÓS et al., 2020).

Os OEs possuem ação antimicrobiana que podem vim a ocorrer de três formas diferentes: pela interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular ou pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares e por último fazendo a inativação e destruição do material genético (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Em um estudo desenvolvido por Oussalah et al., (2007) onde foram testados 28 OEs de espécies vegetais em culturas de *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, mostraram que sete delas possui forte atividade antimicrobiana, sendo o cravo-da-índia uma dessas plantas.

Em outro trabalho, o OE de cravo-da-índia demonstrou amplo efeito inibitório contra bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo *S. aureus* (ATCC 6538), apresentando halos de inibição de 31,5, 32,0 e 32,5 mm para 5, 10 e 15 µL de OE, respectivamente (SILVESTRI et al., 2010).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TESTES DE MASTITE

Foram testadas 86 vacas em lactação de quatro propriedades rurais do município de Dois Vizinhos, sudoeste do Paraná.

Inicialmente as amostras de leite foram testadas para o teste de caneco de fundo preto. Quando apresentavam grumos foram consideradas positivas para a mastite clínica e eram coletadas para as análises subsequentes, e quando não apresentavam grumos foram submetidas ao *California Mastitis Test* (CMT).

Para o teste de CMT foi utilizado reagente contendo Violeta de Bromocresol que indica a presença de células somáticas no leite. Com a aplicação do reagente nas amostras a serem testadas ocorre a formação de um gel com diferentes viscosidades, sendo atribuídos diferentes escores os quais determinam o grau da doença: + (fracamente positivo), ++ (reação positiva) e +++ (reação fortemente positiva) (BRITO et al., 2007). As amostras positivas ao teste de CMT também foram coletadas e direcionadas para a análise.

4.2 PERFIL DAS PROPRIEDADES

Foram escolhidas 4 propriedades localizadas em Dois Vizinhos Paraná, duas localizadas na comunidade de São Roque, uma na comunidade de São Pedro dos Poloneses e a última na comunidade de São Cristóvão. Todas as propriedades possuem a criação em sistema semi-intensivo e a alimentação dos animais são exclusivamente compostas de pastagem e silagem de milho.

As informações coletadas foram a respeito de número total de animais, número de animais em lactação e produtividade média mensal. Foram ainda coletados dados do número de quartos mamários infectados e não infectados para o cálculo da incidência de mastite em cada propriedade.

4.3 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de leite com resultados positivos para o teste da caneca de fundo preto ou CMT foram coletadas em frascos estéreis (10 mL) e armazenadas em caixa térmica com gelo

em gel até o momento das análises no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Dois Vizinhos.

4.4 ISOLAMENTO DAS CEPAS BACTERIANAS

As amostras foram inoculadas em Ágar Vogel-Johnson, adicionado de 5,7 mL de solução estéril de telurito de potássio a 3,5% por litro, com o objetivo de induzir a formação de colônias apenas de *S. aureus*, as quais possuem coloração enegrecida, aspecto brilhante e com a formação de um halo amarelo após as primeiras 24 horas de cultivo (Figura 2) (RODRIGUES, 2008).

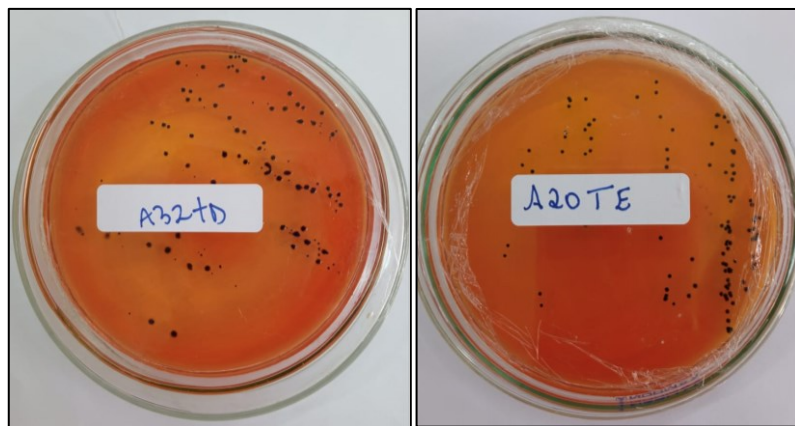


Figura 2 – Cultura em Ágar Vogel-Jhonson com crescimento de colônias de *S. aureus* (A2, B1 e B2).

Fonte: Autoria própria (2020).

Com o auxílio de um swab estéril foi coletada a amostra de leite e inoculada em cada placa contendo Ágar Vogel-Johnson e após o cultivo em estufa de crescimento bacteriológico a 37°C/24 hs, as colônias características para *S. aureus* foram recuperadas com uma alça de platina e semeadas em forma de estriamento em Ágar Muller-Hinton, e cultivadas novamente a 37°C/24 hs.

4.4.1 Teste de coagulase

O teste foi conduzido seguindo as recomendações do fabricante Laboreclin. Para tanto, com o auxílio de uma micropipeta estéril foi adicionado 3.000 µl de solução fisiológica estéril (NaCl 0,85%) no frasco de coagu-plasma. Após a homogeneização, foram adicionados 500 µl de coagu-plasma em um tubo estéril, e com o auxílio de alça de platina flambada, foi coletada

uma alçada da colônia, adicionada no tubo e homogeneizado com a própria alça. Os microtubos foram então incubados a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 4 horas. Ao incliná-lo se verifica a formação do coágulo, quando não há esta formação se interpreta como negativo ao teste da coagulase e positivo quando ocorre a coagulação.

4.5 TESTE DE ANTIBIOGRAMA

O teste de antibiograma seguiu a metodologia descrita na norma M2-A8 do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, 2003), com adaptações. Após o cultivo das cepas em Ágar Muller-Hinton, a 37°C , as colônias recuperadas foram suspensas em água salina estéril (NaCl 0,85%). A turbidez foi ajustada equivalente ao tubo 0,5 da escala McFarland, com a absorbância variando de 0,08 a 0,10, em comprimento de onda de 625 nm. Posteriormente, alíquotas foram transferidas para placas de Petri contendo Ágar Mueller-Hinton com auxílio de *swab* estéril sendo toda a superfície do ágar inoculada (RIBEIRO et al., 2014).

Os antibióticos testados foram escolhidos por serem de classes farmacológicas distintas e com base na literatura, quer sejam: amoxicilina (β -lactâmico), ceftiofur (Cefalosporina de 3^a geração), Enrofloxacin (fluoroquinolonas), estreptomicina (aminoglicosídeos), penicilina (β -lactâmico)/novobiocina (quinolonas) e Sulfazotrim (sulfonamidas).

Após a secagem da superfície do meio do cultivo, foram então adicionados os discos contendo seguintes antibióticos: Amoxicilina (10 μg), Ceftiofur (30 μg), Enrofloxacin (5 μg), Estreptomicina (100 μg), Penicilina/Novobiocina (10UI/30 μg), Sulfazotrim (300 μg).

A avaliação da formação e a medida do tamanho do halo de inibição a partir dos discos, foram medidos manualmente utilizando paquímetro, após 16 a 18 horas de crescimento bacteriano a 37°C , sendo as medidas obtidas interpretadas por meio da comparação com os limites de referência apresentados pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, classificando-se como resistente, intermediário e sensível (COSTA, 2014).

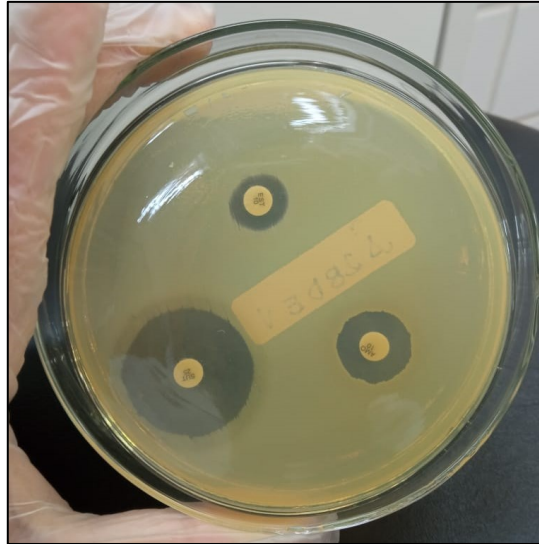


Figura 3 - Representação do teste de susceptibilidade evidenciando o halo de inibição
 Fonte: Autoria própria (2020).

4.6 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Adicionalmente, foi avaliada a atividade antimicrobiana do OE de cravo-da-índia, por meio da metodologia de disco-difusão, descrita na norma M2-A8 da CLSI (2003), com adaptações. O preparo dos inóculos e a temperatura e tempo de incubação foram os mesmos utilizados para o teste de antibiograma.

Foram empregados discos de papel filtro de 6 mm impregnados com 5 mg do OE de cravo-da-índia, os quais foram adicionados ao centro de cada placa de Petri já contendo o inóculo. Após 16 – 18 horas de incubação, foi realizada a medida dos halos de inibição.

4.6.1 Avaliação da composição química do OE de cravo-da-índia

A composição química do OE utilizado nas análises foi acessada por meio de Cromatografia Gasosa associada a Espectrometria de Massas (CG-EM ou CG-MS).

As especificações do cromatógrafo a gás utilizado, bem como as condições analíticas operacionais foram padronizadas e executadas pela Central Analítica do Instituto de Química da USP (Universidade de São Paulo).

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística empregada foi do tipo descritiva, com a porcentagem de frequência de respostas e medidas dos halos de inibição.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PERFIL DAS PROPRIEDADES E INCIDÊNCIA DE MASTITE

No presente trabalho, foram realizados testes para mastite clínica e subclínica em animais lactantes em quatro propriedades leiteiras no município de Dois Vizinhos, Paraná. Os dados referentes ao número total de animais, número de animais em lactação, produtividade média mensal e dados de incidência de mastite são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Comparativos de Incidências de mastite nas propriedades estudadas

	Propriedade A	Propriedade B	Propriedade C	Propriedade D
Nº Total De Animais	23	17	49	56
Nº Animais Em Lactação	18	14	20	34
Produtividade Média Mensal (L)	6000	4000	6700	11000
Nº Total de Quartos Mamários avaliados	72	56	80	136
Nº Quartos Mamários Infectados	13	14	6	17
Incidência De Mastite Por Quartos Mamários	18,1%	25%	7,5%	12,5%

Fonte: Autoria própria (2021).

Foram testadas 86 vacas em lactação e verificou-se que 50 quartos mamários foram positivos para mastite clínica ou subclínica.

Em relação à incidência de mastite nas respectivas propriedades, nota-se que destas, a Propriedade B apresentou o maior valor em relação ao número de quartos mamários infectados (25%), seguido pela Propriedade A (18,1%), Propriedade D (12,5%) e Propriedade C (7,5%) (Tabela 2).

Já em relação ao índice de incidência absoluta de mastites clínica e subclínica sobre o número total de animais lactantes, verificou-se que os índices de mastite nas quatro propriedades estudadas no sudoeste do Paraná apresentaram-se baixos (22,1%), contudo, há a necessidade de reduzi-los o máximo possível. Em um estudo desenvolvido por Jardim et al., (2014) no oeste do Paraná apresentaram índices superiores a 60% de animais infectados nos

rebanhos da região sendo que o estudo foi realizado com 331 animais lactantes em 16 propriedades.

5.2. ISOLAMENTO DE CEPAS DE *S. aureus*

No presente trabalho, foram inoculadas 50 amostras de leite coletadas após a testagem positiva para mastite em bovinos lactantes, das quais, 34 foram positivas para *S. aureus*, constatadas por meio do crescimento de colônias enegrecidas em Ágar Vogel-Johnson com de telurito de potássio e confirmado pelo do teste da coagulasse, configurando uma incidência de *S. aureus* em 68%.

5.3. PERFIL DE SUCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS A ANTIBIÓTICOS

O perfil de susceptibilidade aos antibióticos frente aos isolados de *S. aureus* foi avaliado por meio da interpretação dos resultados obtidos para a medida dos halos de inibição na técnica de disco-difusão. Os limites métricos utilizados para o enquadramento das cepas como sensível, intermediária e resistente para cada antibiótico são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros utilizados para a interpretação das medidas dos halos de inibição

NOME	SIGLA	Sensível	Intermediário		Resistente
		\geq (mm)	(mm)		\leq (mm)
Amoxicilina	AMO	17	14	16	13
Ceftiofur	CTF	21	18	20	17
Enrofloxacina	ENO	23	17	22	16
Estreptomicina	EST	14	11	13	10
Penicilina + Novobiocina	PNM	18	15	17	14
Sulfazotrim	SUT	16	11	15	10

Fonte: Sensifar-Vet Cefar® Discos Para Antibiograma - Uso Veterinário, (2020).

5.3.1. Propriedade A

Na propriedade A foram analisadas 13 amostras e, destas, 7 foram positivas para *S. aureus*, sendo os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas na Propriedade A

Cepa	Halos de inibição (mm)					
	ENO	CTF	PNM	AMO	SUT	EST
A9TE	27	25	28	28	27	13
A14TE	15*	25	26	29	0	0
A15DE	13	27	25	31	0	0
A15DD	16	26	24	26	9	0
A17TD	25	27	25	16	30	13
A17TE	16	29	28	28	7	0
A17DE	23	28	26	26	7	0
CONTROLE	22	24	26	25	21	10

*Negrito indica que a cepa foi classificada como resistente ao antibiótico correspondente.

Fonte: Autoria própria (2021).

Das 7 cepas isoladas na Propriedade A, 4 foram resistentes à Enrofloxacina (ENO) enquanto que para o antibiótico Amoxicilina (AMO), apenas uma cepa se mostrou resistente.

Em estudo conduzido por Langoni et al., 2000, em 184 quartos mamários acometidos por *Staphylococcus aureus*, a Enrofloxacina mostrou-se eficiente em 72% e 75%, pelas vias intramamária e sistêmica, respectivamente. Contudo, nas análises da propriedade A, constatou-se a eficiência deste medicamento em 42,9%. Embora tenham sido testadas apenas 7 cepas, a resistência apresentada à esta droga indica que medidas devem ser adotadas tanto na prevenção da mastite, quanto no uso correto de antibióticos.

Nos antibióticos Sulfazotrim (SUT) e Estreptomicina (EST) 5 cepas se mostraram resistentes a cada antimicrobiano. Além disso, nessa propriedade, foram isoladas 4 cepas multirresistentes, ou seja, que são resistentes a no mínimo três antimicrobianos de classes distintas simultaneamente. Com isso, pôde-se inferir que esta propriedade faz uso frequente de antimicrobianos, assim causando resistência das cepas aos antibióticos.

Observou-se que os antibióticos que melhor surtiram efeito foram o Cefotiofur (CTF) e a Penicilina + Novobiocina (PNM), pois nenhuma cepa se mostrou resistente a estes antimicrobianos. Os resultados obtidos para o Cefotiofur foram semelhantes aos constatados por Costa et al. (2013), em que se obteve um índice de resistência de 0,40% dentre 352 isolados de *S. aureus*. Isso possivelmente deve-se ao amplo espectro de ação desse antimicrobiano pertencente ao grupo das cefalosporinas de 3ª geração, atuando diretamente na inibição da síntese da parede celular bacteriana (RIBEIRO, 2008; SWINKELS et al., 2012). Já a penicilina é um antibiótico β -lactâmico que age através da inibição da biossíntese da parede das células bacterianas, apesar de ter sido o primeiro antibiótico descoberto em 1928, por Alexander

Fleming, atualmente o seu uso em associação com outros agentes terapêuticos se mostra eficiente, tal como a novobiocina, que pertence ao grupo das quinolonas e se liga à DNA girase, afetando o desenvolvimento do DNA, impedindo sua replicação (GOODMAN; GILMAN, 2010). Vale ressaltar que o ceftiofur e a penicilina/novobiocina são antibióticos de largo espectro, portanto, apresentaram maior eficácia dentre os demais (SILVEIRA et al., 2006).

5.3.2. Propriedade B

Na Propriedade B foram analisadas 14 amostras, das quais 100% foram positivas para *S. aureus*, sendo os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos desta propriedade descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas na Propriedade B

Animal	Halos de inibição (mm)					
	ENO	CTF	PNM	AMO	SUT	EST
A20TD	23	25	17	10	26	12
A22TE	26	24	30	28	23	0
A23DE	27	30	22	22	26	21
A24DD	27	28	32	32	29	12
A26DD	28	28	32	28	16	9
A26TE	28	24	31	28	26	0
A26DE	23	23	24	30	26	0
A28DD	24	26	20	21	27	28
A28DE	19	22	14	14	24	12
A31DE	20	24	16	14	22	12
A32DD	20	23	27	27	25	17
A32DE	16	24	29	15	23	0
A32TE	27	25	28	24	29	13
A32TD	16	27	17	23	22	0
CONTROLE	24	26	28	27	23	12

*Negrito indica que a cepa foi classificada como resistente ao antibiótico correspondente.

Fonte: Autoria própria (2021).

Das 14 cepas isoladas 2 foram resistentes à Enrofloxacin (ENO), 1 para o antibiótico Amoxicilina (AMO) e 6 para a Estreptomicina (EST).

O antibiótico Estreptomicina (EST) foi o que menos surtiu resultado positivo nesta propriedade, onde se obteve o maior número de cepas resistentes (42,9%). Em contrapartida, no trabalho desenvolvido por Nader Filho et al. (2007), em que foi avaliada a sensibilidade a

antibióticos de 72 cepas de *S. aureus*, constatou-se 94,4% de sensibilidade frente a estreptomicina, índice superior ao obtido no presente estudo, que foi de 57,1%.

Não obstante, para os antibióticos Ceftiofur (CTF) e Sulfazotrim (SUT), todas as cepas isoladas mostraram-se sensíveis (100%).

Observou-se que esta propriedade foi a que apresentou maior incidência de quartos mamários infectados por *S. aureus* (25%) podendo ser consequência do uso inadequado de antibióticos, sendo tal condição refletida nas amostras que foram coletadas.

5.3.3. Propriedade C

Na Propriedade C foram analisadas 6 amostras e 4 foram positivas para *S. aureus*, sendo os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos dessa propriedade (C), apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas na Propriedade C

Cepa	Halos de inibição (mm)					
	ENO	CTF	PNM	AMO	SUT	EST
A44TE	24	26	31	27	17	13
A46TD	23	32	30	30	18	16
A46DD	21	37	32	35	22	21
CONTROLE	24	23	26	25	22	14

*Negrito indica que a cepa foi classificada como resistente ao antibiótico correspondente.

Fonte: Autoria própria (2021).

Na propriedade C das 4 cepas isoladas, 1 mostrou-se intermediária para Enrofloxacina (ENO) e outra para a Estreptomicina (EST). O uso de antimicrobianos contra bactérias cuja sensibilidade seja caracterizada como intermediária, pode levar ao desenvolvimento de resistência, não sendo o mais indicado para o tratamento (PINHEIRO et al., 2010).

Nessa propriedade, nenhuma cepa apresentou resistência aos antibióticos testados. Os antibióticos que melhor surtiram resultado foram Ceftiofur (CTF), Penicilina + Novobiocina (PNM), Amoxicilina (AMO) e Sulfazotrim (SUT). Nota-se que esta propriedade foi a que apresentou menor incidência de mastite por quartos mamários (7,5%) possivelmente devido ao uso correto de antibióticos e à adoção de práticas de manejo preventivas, evitando o desenvolvimento de resistência nos microrganismos causadores da mastite bovina.

5.3.4. Propriedade D

Na Propriedade D, foram analisadas 17 amostras e destas, 10 foram positivas para *S. aureus*, os resultados do perfil de susceptibilidade a antibióticos estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Perfil de susceptibilidade a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas na Propriedade D

Cepa	Halos de inibição (mm)					
	ENO	CTF	PNM	AMO	SUT	EST
A54DD	25	26	30	26	22	12
A57DD	26	28	30	28	26	15
A57DE	26	22	20	24	17	15
A57TD	21	22	26	20	18	12
A57TE	24	23	26	26	16	17
A58TD	20	23	28	24	18	16
A59TD	15	18	18	20	13	24
A59TE	25	25	27	27	21	14
A59DD	20	20	25	26	18	16
A61TE	24	23	22	25	18	15
CONTROLE	20	20	24	18	16	10

*Negrito indica que a cepa foi classificada como resistente ao antibiótico correspondente.

Fonte: Autoria própria (2021).

Das 10 cepas estudadas somente 1 apresentou resistência para a Enrofloxacina (ENO). No estudo desenvolvido por Langoni et al. (2000), em que foram avaliados 184 quartos mamários positivos para *S. aureus*, foi constatada a eficácia da Enrofloxacina de 73,5%. Dessa forma, explica-se a ocorrência de resistência nas cepas do presente trabalho.

As cepas foram sensíveis aos antibióticos Amoxicilina (AMO), Cefotiofur (CTF), Penicilina + Novobiocina (PNM) e Sulfazotrim (SUT) podendo ser feito o uso dos mesmos para o tratamento da mastite. Nesta propriedade pôde-se observar que o produtor faz uso racional de antibióticos.

5.3.5. Conclusões sobre o perfil de susceptibilidade

No presente estudo, foram realizados o isolamento e a avaliação do perfil de susceptibilidade a antibióticos para 34 cepas de *S. aureus* causadores de mastite bovina. Dessas, a maioria apresentou sensibilidade aos antibióticos testados, entretanto, aproximadamente 40%

(14) apresentaram resistência a no mínimo um antibiótico (incluindo ENO, SUT e EST), sendo dessas 11% (4) classificadas como multirresistentes.

Ao detectar a presença de mastite subclínica no animal e dar início ao tratamento deve-se atentar para que não ocorra a contaminação cruzada, que nada mais é que a realização da ordenha de um animal contaminado e, em seguida, a de um animal saudável, podendo causar novas infecções no rebanho. O mais indicado neste caso seria que após detectada a doença e o tratamento não venha a se mostrar efetivo, seja realizada a interrupção da lactação do animal.

Além disso, após a cultura, antibiograma e identificação microbiana do patógeno, pode-se adicionalmente realizar a análise de contagem padrão em placas da ordenhadeira, das mãos do manipulador, por exemplo, a fim de identificar focos da doença.

A escolha do antibiótico a ser utilizado deve ser baseado naquele em que a bactéria apresentou sensibilidade e, de preferência, que seja o mais antigo, tendo em vista que ao se utilizar antibióticos de gerações mais recentes e as cepas desenvolverem resistência chegará ao ponto de não haver antibiótico disponível para combatê-las.

Após os resultados obtidos neste estudo, foram prestadas informações a respeito de melhorias nas condições do local de ordenha, higiene pessoal, limpeza, estrutura, alimentação, linha de ordenha, pré e pós-*dipping*, de modo a evitar a necessidade do uso contínuo de antibióticos para o tratamento.

5.4. CONTROLE ALTERNATIVO DE *S. aureus* COM O ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO-DA-ÍNDIA

Devido ao percentual de cepas resistentes isoladas no presente trabalho, é de extrema importância a busca por produtos alternativos para o controle desses microrganismos, sendo uma das alternativas o uso de OEs.

O OE de cravo-da-índia apresentou amplo efeito inibitório contra as cepas de *S. aureus* isoladas de mastite bovina, incluindo as cepas multirresistentes. Os valores referentes aos halos de inibição, bem como a comparação com o antibiótico de menor eficiência para cada cepa são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Perfil de susceptibilidade e atividade antimicrobiana do OE de cravo-da-índia das cepas de *S. aureus* resistentes.

Cepa	Tamanho do halo (mm)		
	OE de Cravo-da-índia	Antibiótico	Valor
A14TE	15	EST	0
A15DE	16	EST	0

A15DD	15	EST	0
A17TD	11	EST	0
A17TE	17	EST	0
A17DE	14	EST	0
A20TD	13	AMO	10
A22TE	12	EST	0
A26DD	11	EST	0
A26TE	12	EST	0
A26DE	10	EST	0
A32DE	12	EST	0
A32TD	17	EST	0
A59TD	12	ENO	15

Fonte: Autoria própria (2021).

O OE de cravo-da-índia é um reconhecido antimicrobiano natural, sendo já relatado na literatura em inúmeros estudos (COSTA JÚNIOR et al., 2019; RADÜNZ et al., 2019; XU et al. 2016). No presente trabalho, foi evidenciado o efeito do mesmo contra cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos.

Dentre os principais compostos químicos responsáveis por esse efeito está o eugenol (70,16%), um fenilpropanoide que caracteriza esse OE (ZARDO et al., 2019; GOMES et al., 2018; AFFONSO et al., 2012). Além disso, ainda foram identificados como compostos majoritários o cariofileno (24,77%) e o humuleno (4,38%) (Tabela 9, Apêndice A).

Tabela 9 - Composição química do óleo essencial de cravo-da-índia

Nº	Composto	Fórmula molecular	Classe	T.R.	Área %
1	2,2-dimetoxibutano	C ₆ H ₁₄ O ₂	Éter	2.941	0,05
2	Eugenol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	Fenilpropanoide	25.368	70,16
3	α-cubebeno	C ₁₅ H ₂₄	Sesquiterpeno	25.896	0,16
4	Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	Sesquiterpeno	27.751	24,77
5	Humuleno	C ₁₅ H ₂₄	Sesquiterpeno	29.093	4,38
6	δ-cadineno	C ₁₅ H ₂₄	Sesquiterpeno	31.923	0,28
7	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	Sesquiterpeno	34.180	0,20

Fonte: Autoria própria (2021).

Dentre os principais mecanismos de ação dos OEs sobre bactérias, está a modificação na composição química e na estrutura da membrana plasmática, levando a alterações fisiológicas que acabam por inibir a reprodução, podendo levar à morte celular (RAO; CHEN; MCCLEMENTS, 2019).

O OE de cravo-da-índia promove a degradação da parede celular do *S. aureus*, aumentando a permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo citoplasmático, além disso, o eugenol mais especificamente atua na inibição de enzimas como amilases e proteases inviabilizando a obtenção de energia, levando ao efeito antimicrobiano desse OE (XU et al. 2016).

No presente trabalho, os halos de inibição obtidos para o OE de cravo-da-índia sobre as cepas de resistentes de *S. aureus* foram de 10 – 17 mm, demonstrando a efetividade in vitro para esta bactéria que é o principal agente causador da mastite. Em outro estudo utilizando o mesmo OE contra a cepa de *S. aureus* ATCC 25923 (não resistente), também foram obtidos halos de inibição que variaram de 10 – 15 mm, confirmando a efetividade desse produto no controle de *S. aureus* (PERREIRA et al., 2008).

Em cepas de *S. aureus* formadoras de biofilme bacteriano isoladas de mastite bovina, o OE de cravo-da-índia e o eugenol purificado apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 0,187 e 0,211 mg/mL, respectivamente, reforçando o potencial que esse OE apresenta, inclusive em relação ao seu composto majoritário isolado, o eugenol, validando a hipótese do efeito sinérgico entre os compostos formadores do OE (BUDRI et al., 2015).

6. CONCLUSÃO

Verificou-se a presença mastite clínica e subclínica nos rebanhos leiteiros estudados.

A maioria dos antibióticos testados foram efetivos no controle *in vitro* das cepas *S. aureus* isoladas de mastite bovina, sendo no entanto, evidenciada resistência antimicrobiana, especialmente frente à estreptomicina, sulfazotrim e enrofloxacina.

Os resultados bem como medidas corretivas e preventivas foram apresentadas aos produtores rurais a fim de evitar prejuízos econômicos e promover a saúde e produtividade do rebanho.

Adicionalmente, foi constatado o efeito inibitório do OE de cravo-da-índia que apresentou potencial antimicrobiano frente às cepas de *S. aureus* resistentes, sendo identificados seus principais componentes, no entanto, é necessário o desenvolvimento de estudos mais aprofundados frente à sua utilização no controle alternativo de mastite bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 2, p. 146-161, 2012.
- ANDRADE, F. M. 2018. **M. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus spp.* EM MASTITE BOVINA – REVISÃO DE LITERATURA**. Trabalho de Conclusão de curso (Graduação em Medicina veterinária) UNIFOR - MG, Formiga.
- ANUARIO LEITE 2020. Anuário leite 2020, Indicadores, para quem vive oportunidades tendências e no setor leiteiro. **Embrapa**, p. 116, 2020.
- BAPTISTA, J. R.; SUGAMOSTO, M.; WAVRUK, P. Características e perspectivas da indústria de laticínio do Paraná. **Caderno Ipardes**, v. 1, n. 1, p. 32–46, 2011.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. O consumo de cálcio e a osteoporose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 26, n. 1, p. 3, 2005.
- BRASIL. Instrução Normativa no 51, de 20 de setembro de 2002. Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo... Diário Oficial da União, Brasília, p.13, 21 set. 2002. Seção 1.
- BRASIL. Instrução Normativa n. 76 de 26 de novembro de 2018. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial da União (da República Federativa do Brasil), Brasília, Seção 1, n.230, p.9, 30 nov. 2018.
- BRITO, J. R. F. et al. SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO CALIFORNIA MASTITIS TEST COMO RECURSO DIAGNÓSTICO DA MASTITE SUBCLÍNICA EM RELAÇÃO À CONTAGEM DE CÉLULAS SOMÁTICAS. **Pesq. Vet. Bras**, p. 49–53, 1997.
- BRITO, M. A. et al. Mastite 2007. Brasília, DF: Agência de Informação Embrapa. Agronegócio do Leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_202_21720039247.html>. Acesso em: 14. 2010.
- CARVALHO, N. L. DE; BEURON, D. C.; SANTOS, M. V. DOS. Impactos econômicos da mastite. **Revista leite integral**, v. 6, p. 22–26, 2012.
- COSTA, L. F. R. Método automático para identificação da região de inibição e de rótulos alfanuméricos de antibióticos posicionados em antibiogramas por disco-difusão. **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica**, p. 1–62, 2014.
- COSTA, C.M.G.R.; SANTOS, M.S.; BARROS, H.M.M.; AGRA, P.F.M.; FARIAS, M.A.A. Efeito inibitório do óleo essencial de manjeriço sobre o crescimento *in vitro* de *Erwinia carotovora*. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.3, n.3, p.35-38, 2009.
- COSTA, A. C. DA. 2010. Mastite subclínica: patógenos isolados e respectiva sensibilidade antimicrobiana, variação da contagem de células somáticas e fatores de risco. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

- COSTA, E. O. Importância da mastite na produção leiteira do país. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP**, v. 1, p. 003, 1998.
- COSTA J. P. S. P. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes especiarias. **Hig. alim.**, p. 2697-2701, 2019.
- CSIKÓS, E. et al. Efeitos dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L., *Cinnamomum verum* J. Presl e *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle no modelo de camundongo com inflamação aguda das vias aéreas induzida por endotoxina. **Molecules**, v. 25, n. 15, pág. 3553, 2020.
- DE FREITAS, M. F. L. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase positivos* isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de pernambuco. **Arq. Inst. Biol**, n. 2, p. 171–177, 2005.
- DEMEU, F. A. et al. Influência do descarte involuntário de matrizes no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Ciênc. agrotec**, v. 35, p. 195–202, 2011.
- DEMEU, F. A. et al. Influência da escala de produção no impacto econômico da mastite em rebanhos bovinos leiteiros. **Ceres**, v. 62, p. 167–174, 2015.
- FAGAN, E. P. et al. Semina: Ciências Agrárias. **Ciências Agrárias**, v. 29, p. 651–660, 2008.
- IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2018. **Diretoria de Pesquisas**, v. 46, p. 1–8, 2018.
- FONSECA, L. F. L. da; SANTOS, M. V. dos. **Qualidade do leite e controle de mastite**. São Paulo, SP: Lemos Editorial, 2000, 175 p.
- GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2010.
- GOMES, P. R. B. et al. Caracterização química e citotoxicidade do óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacéuticas**, v. 47, n. 1, p. 37-52, 2018.
- IBGE. Indicadores IBGE Estatística da Produção Pecuária. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE**, p. 48, 2019.
- JARDIM, J. G. et al. Perfil etiológico da mastite bovina na bacia leiteira do oeste paranaense, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 36, n. 1, p. 65-70, 2014.
- KALEMBA, D. A. A. K.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.
- LANGONI, H. et al. Utilização da enrofloxacin (Baytril®) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 167–170, 2000.
- LANGONI, H. et al. Tratamento da mastite clínica bovina com associação de cefalexina, neomicina e prednisolona: resultados preliminares. **Rev. Acad. Ciênc. Anim**, v. 15, n. 2, p. 595–596, 2017.

MATTE JÚNIOR, A. A.; JUNG, C. F. Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, v. 19, n. 1, p. 34, 2017.

MEDEIROS, E. S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 569–574, 2009.

MENDONÇA, C. L. et al. EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícias**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, p. 206–217, 2002.

NADER FILHO, A. et al. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 74, n. 1, p. 1-4, 2007.

NÁDIA et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru produzido em duas propriedades no extremo oeste de Santa Catarina, Brasil. **Food and Public Health**, v. 2, n. 3, p. 79–84, 2012.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard, Eighth Edition. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, 2003.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414–420, 2007.

PEDRINI, S. C. B.; MARGATHO, L. F. F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arq. Inst. Biol**, v. 4, p. 391–395, 2003.

PINHEIRO, L. et al. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas. **PUBVET**, v. 4, n. 34, 2010.

RAMOS, F. S. et al. Importância do diagnóstico da mastite subclínica e seus impactos econômicos em propriedades leiteiras – Revisão de literatura. **Facisa em Revista**, v. 1, p. 44–52, 2017.

RAO, J.; CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J. Improving the efficacy of essential oils as antimicrobials in foods: Mechanisms of action. Annual review of food science and technology, v. 10, p. 365-387, 2019.

RIBEIRO, M. et al. Relação Entre mastite clínica, subclínica indecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 3, 2003.

RIBEIRO, W. O. et al. ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS CAUSADORES DA MASTITE BOVINA E ESTUDO DA AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS. **Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 45–52, 2014.

RODRIGUES, A. P. Preparação e caracterização de membranas de quitosana e alginato para aplicação na terapia de lesões. **Sistema de Bibliotecas da Unicamp**, p. 174, 2008.

SCHVARZ, D. W.; DOS SANTOS, J. M. G. Mastite bovina em rebanhos leiteiros: Ocorrência e métodos de controle e prevenção. **Revista em Agronegocio e Meio Ambiente**, v. 5, n. 3, p. 453–473, 2012.

SILVA, M. V. M. et al. A MASTITE INTERFERINDO NO PADRÃO DE QUALIDADE DO LEITE: UMA PREOCUPAÇÃO NECESSÁRIA. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, v. 3, n. 14, p. 1–10, 2010.

SILVEIRA, G.P.; et al. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SILVESTRI, J. D. F et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, p. 589-594, 2010.

SIMÕES, T. V. M. D. S. et al. Identifi cação Laboratorial de *Staphylococcus aureus* em Leite Bovino Tânia. **Embrapa**, v. 1, p. 1–17, 2013.

SOUZA, K. S. S. DE S. et al. Resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de vacas leiteiras com mastite subclínica. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 83–89, 2016.

TOZZETTI, D. S.; BATAIER, M. B. N.; ALMEIDA, L. R. DE. PREVENÇÃO, CONTROLE E TRATAMENTO DAS MASTITES BOVINAS-REVISÃO DE LITERATURA. **REVISTA CIENTÍFICA ELETÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, v. 6, n. 10, 2008.

VEIGA, V. M. DE O. **Diagnóstico da mastite bovina**. Embrapa gado de leite. p. 24, 1998.

VOLPI, R.; DIGIOVANI, M. S. C. Aspectos econômicos da produção e dados estatísticos. **Boletim Informativo - FAEP**, 2008.

XU, J. G.; LIU, T.; HU, Q. P.; CAO, X. M. Chemical Composition, Antibacterial Properties and Mechanism of Action of Essential Oil from Clove Buds against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1194, 2016.

ZARDO, N. et al. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO PODER DE DISSOLUÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ANIS-ESTRELADO (*Illicium verum*) E CRAVO DA ÍNDIA (*Syzygium aromaticum*) PARA RECICLAGEM DO ISOPOR. **Anais da Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnológica Interdisciplinar (MICTI)**, v. 1, n. 12, 2019.

ZSCHÖCK, M.; BOTZLER, D.; BLÖCHER, S.; SOMMERHÄUSEN, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (ent) and toxic shock syndrome toxin-1 (tst) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, Berling, v.10, p.569-574, 2000.

Apêndice A- Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia

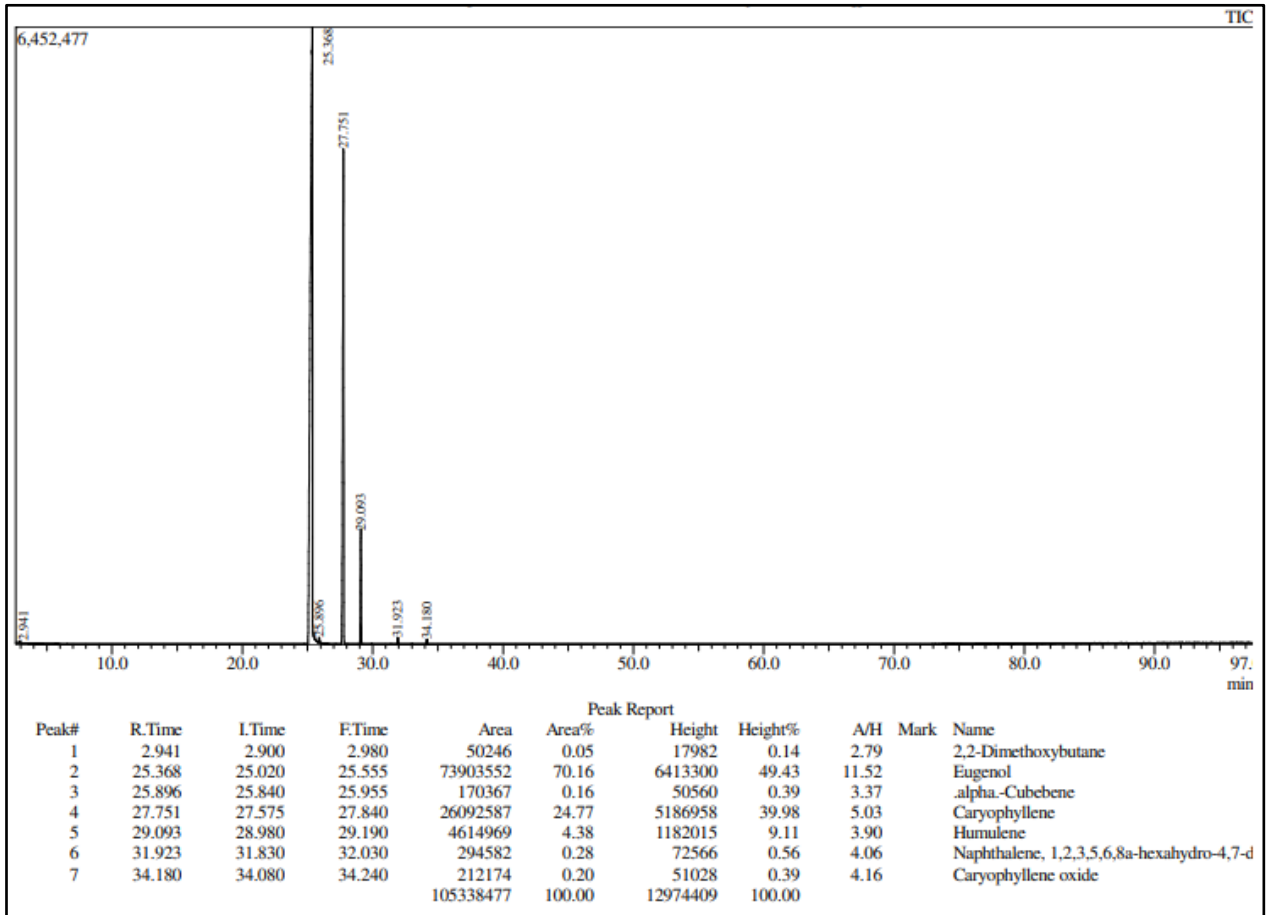


Figura A1 – Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia