



# COINTER PDVAgro 2023

VIII CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Edição Presencial Recife (PE) | 29, 30 de nov a 1 de dez

ISSN: 2526-7701 | PREFIXO DOI: 10.31692/2526-7701

## DETECÇÃO DE BOMBA DE EFLUXO EM ESPÉCIES DE *Staphylococcus* COAGULASE NEGATIVA ISOLADAS DE MASTITE CAPRINA

## DETECCIÓN DE LA BOMBA DE EFLUJO EN ESPECIES *Staphylococcus* COAGULASA NEGATIVO AISLADOS DE MASTITIS DE CABRA

## DETECTION OF EFFLUX PUMP IN COAGULASE NEGATIVE *Staphylococcus* SPECIES ISOLATED FROM GOAT MASTITIS

Apresentação: Pôster

Hiandrey Sabrina Torres de Sá<sup>1</sup>; Júlio César da Silva Vieira<sup>2</sup>; Sayonara Germano Barreto<sup>3</sup>; Ana Clara Neves dos Santos<sup>4</sup>; Elizabete Rodrigues da Silva<sup>5</sup>

### INTRODUÇÃO

A mastite caprina é uma enfermidade definida como a inflamação da glândula mamária, que pode ser classificada em clínica e subclínica, de acordo com a presença ou não de sinais clínicos, nesta ordem (MELO, 2012; ORDONHO, 2021). A etiologia da mastite expõe uma multiplicidade de agentes, sobretudo os agentes bacterianos (ACOSTA et al., 2016). Dentre os agentes bacterianos causadores de mastite caprina, observa-se uma elevada ocorrência do gênero *Staphylococcus*, onde os quais podem ser agrupados de acordo com a produção da enzima coagulase em *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase (SCN) (TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

Os *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) são o grupo de microrganismos de maior ocorrência em glândulas mamárias de caprinos, onde podem causar infecções persistentes ao longo da lactação ou até mesmo durante o período seco (MELO, 2012; ANDRADE et al., 2012).

O controle da mastite em rebanhos leiteiros é feito, dentre outras medidas, pelo uso de antimicrobianos, preferencialmente de curto espectro. Para tanto, se faz necessário à identificação do agente etiológico, o que na maioria das vezes não é possível, particularmente em animais de fazenda, o que leva a utilização de antimicrobianos de amplo

<sup>1</sup> Medicina Veterinária, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, [hiandreytorres@gmail.com](mailto:hiandreytorres@gmail.com)

<sup>2</sup> Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, UFRPE, [julio\\_cesar\\_mv@yahoo.com](mailto:julio_cesar_mv@yahoo.com)

<sup>3</sup> Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, UFRPE, [barretosayonara@gmail.com](mailto:barretosayonara@gmail.com)

<sup>4</sup> Medicina Veterinária, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, [ana.clara35@gmail.com](mailto:ana.clara35@gmail.com)

<sup>5</sup> Professora, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, [elizabete.rodrigues@ufape.edu.br](mailto:elizabete.rodrigues@ufape.edu.br)

espectro como uma alternativa vantajosa. No entanto, a utilização desses antimicrobianos apresenta uma grande desvantagem, que é o surgimento de cepas bacterianas resistentes, como é o caso de *Staphylococcus aureus*, recorrente em casos de mastite de ruminantes (BELO, 2016; TORTORA; FUNK; CASE, 2017).

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente. Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos são a inativação do antibiótico por alterações químicas, modificação do alvo que leva a perda de sensibilidade ao antibiótico, bombeamento do antibiótico para o meio extracelular e impermeabilidade à droga (BARBOSA et al., 2022).

O sistema de bombeamento ou efluxo é um dos mecanismos de resistência bacteriana que as tornam tolerantes aos antibióticos. É mediado por canais transportadores presentes na membrana plasmática das bactérias, constituídos por proteínas. Funcionalmente tem a capacidade de eliminar, para o meio extracelular, compostos nocivos para a célula (CUNHA, 2023). Logo, quando expressas, conferem um elevado nível de resistência a antibióticos que são úteis na clínica médica (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; CUNHA, 2023). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença do mecanismo de bomba de efluxo em *Staphylococcus* spp. isolados de mastite caprina.

## FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma preocupação mundial e tem sido motivo de frequentes discussões, uma vez que impactam diretamente a saúde única (SILVA et al., 2020). Em espécies do gênero *Staphylococcus* é a RAM um fenômeno frequente, favorecido pelo uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção, causando pressão seletiva sobre a microbiota, selecionando os patógenos resistentes (GUEDES, 2021).

Pela primeira vez identificadas em cepas de *Escherichia coli* resistentes à tetraciclina, as bombas de efluxo, também conhecidas como sistemas de efluxo rápido, são proteínas transmembrana com a capacidade de expelir diversas moléculas para fora das células. Esse mecanismo, quando presente, evita que substâncias indesejadas se acumulem no citoplasma celular e, de certa forma, bloqueando seu acesso aos locais de ação pretendidos (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008).

Nas bactérias, as bombas de efluxo desempenham um papel crucial na fisiologia e na



defesa desses microrganismos, já que são responsáveis por exportar uma ampla gama de substratos, incluindo antimicrobianos como fluoroquinolonas, tetraciclina e cloranfenicol. Além disso, elas podem eliminar corantes como brometo de etídio e acriflavina, bem como toxinas (BLAIR et al., 2015).

O mecanismo de bomba de efluxo pode ser expresso frente a todas as classes de antibióticos, porém, por meio de sua categorização em cinco classes de transporte, pode apresentar bombas que são específicas e eficazes na presença de macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; TINTINO, 2018).

## **METODOLOGIA**

Ao todo 95 amostras de *Staphylococcus spp.* fizeram parte do estudo, tais amostras fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco e foram isoladas de cabras com mastite subclínica, oriundos de rebanhos leiteiros localizados em municípios dos estados de Pernambuco, Paraíba, Rio de Janeiro e Ceará. Os isolados estavam criopreservados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ , onde foram reativadas em meio BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Índia). O mecanismo de bomba de efluxo foi pesquisado utilizando-se a metodologia proposta por Ugwuanyi et al. (2021), com modificações; baseado na capacidade das bactérias expulsarem o brometo de etídio (BrEt).

No dia do experimento foram preparadas placas com Ágar Mueller Hinton (KASVI, Espanha) contendo 0,5mg/L de BrEt (Invitrogen, EUA.), além de placas sem BrEt consideradas como controle. Todo o preparo e acondicionamento das placas foram realizados em ambiente escuro. Além disso, após o preparo, as placas foram envolvidas em papel alumínio para evitar exposição à luz. As amostras bacterianas foram inoculadas no formato de estrela radiada e incubadas em estufa de aerobiose a  $37^{\circ}$  por 24 horas, quando realizou-se a leitura em transiluminador e foi feito o registro dos resultados.

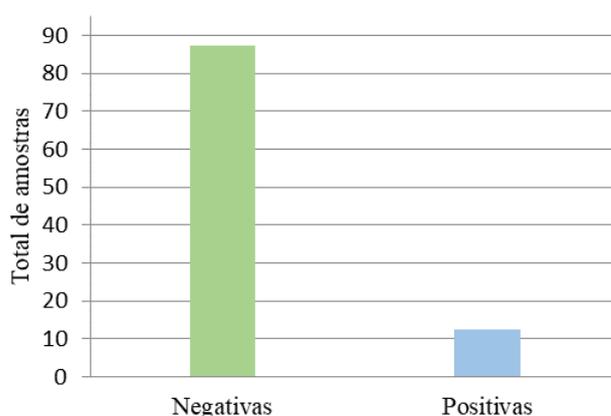
Para a interpretação foram considerados os critérios adotados por Ugwuanyi e colaboradores (2021), em que amostras apresentando qualquer grau de luminescência (brilho) são consideradas negativas para bomba de efluxo. Por outro lado, amostras que não apresentam luminescência são consideradas positivas. Os dados foram tabulados e analisados em planilhas do Excel®, calculando-se as frequências do mecanismo de resistência, de acordo com a espécie bacteriana.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa de bomba de efluxo foi realizada em 95 amostras bacterianas do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa, sendo *S. chromogenes* (n=19), *S. caprae* (n=18), *S. simulans* (n=19), *S. capitis* subsp. *ureolyticus* (n=20) e *S. epidermidis* (n=19). Como demonstrado na Figura 01, do total de amostras analisadas, 12 (12,6%) apresentaram reação positiva para a presença de algum tipo de bomba de efluxo e 83 (87,4%) apresentaram reação negativa.

**Figura 01:** Frequência relativa de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa positivas e negativas para a presença do mecanismo de bomba de efluxo.



Fonte: Própria (2023).

Isoladamente foi possível observar que para cada uma das espécies investigadas, a espécie *S. chromogenes* apresentou duas amostras (10,5%) positivas e 17 (89,5%) negativas; *S. caprae* duas (11%) positivas e 16 (89%) negativas; *S. simulans* uma (5,3%) positiva e 18 (94,7%) negativas; *S. capitis* subsp. *ureolyticus* cinco (25%) positivas e 15 (75%) negativas e *S. epidermidis* duas amostras (10,5%) positivas e 17 (89,5%) negativas para a presença de bomba de efluxo.

Os resultados do presente estudo apresentam semelhança aos demonstrados por França et al. (2012). Avaliando os padrões de resistência antimicrobiana em 210 amostras de *Staphylococcus spp.* isoladas de mastite em pequenos ruminantes, os autores observaram que 41 foram consideradas positivas para a presença de bomba de efluxo, representando 19,5% dos isolados investigados.

O mecanismo de bomba de efluxo é um fator de virulência que contribui para o aumento do potencial patogênico dos microrganismos. A sua expressão está relacionada à resistência simultânea de bactérias frente a diferentes classes de antimicrobianos, onde são



capazes de realizar a extrusão do fármaco, promovendo fenótipos de resistência a múltiplos antibióticos, tais como tetraciclina e fluoroquinolonas, rotineiramente utilizados na terapêutica de mastite e outras doenças bacterianas em rebanhos leiteiros (FRANÇA, 2021).

## CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de mastite caprina possuem o mecanismo de bomba de efluxo, dessa forma, é possível que o tratamento da enfermidade no ambiente de fazenda poderá não ser eficaz, causando prejuízos econômicos ao produtor e representando riscos à saúde única.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. et al. Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 36, n. 7, p. 565-573, jul. 2016. FapUNIFESP (SciELO).
- ANDRADE, N. P. C. et al. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de *Staphylococcus spp.* coagulase negativa de um rebanho leiteiro caprino em Santa Maria da Boa Vista - PE. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1-6, 2012.
- BARBOSA, D. B. M. et al. Resistência bacteriana com uso de antibióticos. **Revista de trabalhos acadêmicos-universo-Goiânia**. Anais - Jornada Científica de Pesquisa e Extensão, ano 7, v. 1, n. 10. Goiânia-GO, 2022.
- BELO, A. M. F. P. Mastites em pequenos ruminantes: principais agentes etiológicos. **Monografia da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas** - Universidade de Coimbra. Portugal- PT. 2016.
- BLAIR, J. M. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, 13, 42-51, 2015.
- CUNHA, I. V. Revisão de estudos da combinação de fotossensibilizadores com inibidores de bomba de efluxo NorA na Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana e planejamento de um híbrido de Azure A com Capsaicina. **Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial)** – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2023.
- DŽIDIĆ, SENKA; ŠUŠKOVIĆ, JAGODA; KOS, BLAŽENKA. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. **Food Technology & Biotechnology**, v. 46, n. 1, 2008.
- FRANÇA, C. A. et al. Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus spp.* da mastite de pequenos ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S.L.], v. 32, p. 747-753, ago. 2012.



FRANÇA, C. A. D. Tolerância e persistência à enrofloxacina em *Staphylococcus spp.* de mastite caprina: caracterização, determinação de fatores de virulência e genômica comparativa. **Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Renorbio))** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, 2021.

GUEDES, M. K. Brometo de etídio na identificação de bombas de efluxo em bactérias para controle de mastite bovina: revisão integrativa. **Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária)** – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia-PB. 2021.

MELO, D. B. Mastite subclínica em cabras do Semiárido Paraibano. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária** - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB. 2012.

ORDONHO, R. F. Identificação do perfil de resistência antimicrobiana de cepas do gênero *Staphylococcus SPP.* oriundas de casos de mastite em rebanhos leiteiros do agreste paraibano. **Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária)** – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia-PB. 2021.

SILVA, R. A. et al. Antimicrobial Resistance: formulation of the response in the global health context. **Saúde Debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020.

TORTORA, G. J.; FUNK, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Cap. 20, p 554-559.

TINTINO, S. R. Avaliação da inibição de bombas de efluxos em linhagens de *Staphylococcus aureus* por substâncias sintéticas de origem natural. **Tese de Doutorado em Biotecnologia da Saúde** – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife-PE. 2018.

