

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v19n03e1745>

Detecção de bomba de efluxo em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de mastite caprina

Hiandrey Sabrina Torres de Sá¹, Júlio César da Silva Vieira², Ana Clara Neves dos Santos¹, Maria Izadora da Silva¹, Elizabete Rodrigues da Silva^{3*}

¹Discente da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Curso de Medicina Veterinária, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

²Pós-graduando em Saúde Animal, Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

³Docente da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Área Microbiologia Animal, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

*Autor para correspondência, e-mail: elizabete.rodrigues@ufape.edu.br

Resumo. O sistema de efluxo é um dos mecanismos que confere resistência bacteriana a diversas classes de compostos químicos, seja antibiótico, corante, antisséptico ou desinfetante. O objetivo deste estudo foi investigar a presença de bomba de efluxo em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas do leite de cabras com mastite subclínica. Para investigar a presença desse mecanismo foi utilizada a metodologia baseada na expulsão de brometo de etídio (BrEt). Os resultados obtidos demonstraram que das 95 amostras bacterianas investigadas, 12 (12,6%) foram positivas para a presença de bomba de efluxo e 83 (87,4%) negativas. Os isolados de *S. capitis* subsp. *ureolyticus* demonstraram o maior percentual de positividade entre as espécies avaliadas. Os resultados demonstram que *Staphylococcus* do grupo coagulase negativa causadores de mastite caprina portam um importante mecanismo de resistência antibiótica que poderá interferir com o tratamento da enfermidade no ambiente de fazenda, causando prejuízos econômicos ao produtor e representando riscos à saúde única.

Palavras-chave: Antibioticoterapia, resistência antimicrobiana, saúde animal.

Detection of efflux pump in coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis

Abstract. The efflux system is one of the mechanisms responsible for conferring bacterial resistance to various classes of chemical compounds, whether antibiotic, dye, antiseptic or disinfectant. The aim of this study was to investigate the presence of efflux pump in coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from dairy goats' subclinical mastitis. To investigate the presence of this mechanism was used the methodology based on ethidium bromide (BrEt) expulsion. The results showed that of the 95 bacterial strains investigated, 12 (12.6%) were positive for the presence of efflux pump and 83 (87.4%) were negative. The isolates of *S. capitis* subsp. *ureolyticus* showed the highest percentage of positivity among the evaluated species. The results demonstrate that coagulase-negative *Staphylococcus* from goat mastitis carry an important antimicrobial resistance mechanism which may interfere with the treatment of the disease in the farm environment, causing economic losses to the farmer and representing public health risks.

Keywords: Antibiotic therapy, antimicrobial resistance, animal health

Introdução

A mastite é 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 ([Koop et al., 2010](#); [Tangorra et al., 2010](#)). Em caprinos, a enfermidade é causada por diversos agentes bacterianos, com elevada ocorrência de

espécies do gênero *Staphylococcus*, particularmente do grupo *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) ([Akter et al., 2020](#); [Brabes et al., 1999](#); [Santos et al., 2011](#); [Suwito et al., 2021](#)). O controle dessa enfermidade inclui, dentre outras medidas, o uso de antibióticos, preferencialmente os de curto espectro ([Alves et al., 2020](#); [Jesus & Coutinho, 2018](#); [Paim et al., 2020](#)). Para tanto, se faz necessária a identificação do agente etiológico, o que na maioria das vezes não é possível, principalmente em animais de fazenda, o que leva a utilização de antibióticos de amplo espectro como uma alternativa vantajosa. No entanto, o uso incorreto desses fármacos favorece a seleção de cepas bacterianas resistentes, comprometendo o sucesso do tratamento e a produção futura do animal acometido ([Morales-Ubaldo et al., 2023](#); [Spaulding et al., 2018](#)).

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma preocupação mundial e tem sido motivo de frequentes discussões, uma vez que impacta diretamente a saúde única ([Calderón & Ulate, 2017](#); [Estrela, 2018](#); [Scaldaferri et al., 2020](#); [Souza et al., 2016](#)). Em espécies do gênero *Staphylococcus* a RAM é um fenômeno frequente, favorecido pelo uso indiscriminado de antibióticos que funcionam como ferramenta de seleção de patógenos resistentes ([Naranjo-Lucena & Slowey, 2023](#); [Silva et al., 2020](#)). Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes aos antibióticos são a inativação enzimática, modificação do alvo do antibiótico, bombeamento do antibiótico para o meio extracelular e impermeabilidade à droga ([Wang et al., 2023](#)).

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 têm a capacidade de eliminar, para o meio extracelular, compostos nocivos para a célula. Logo, quando expressas, conferem um elevado nível de resistência a antibióticos que são úteis na clínica médica ([Costa & Silva Júnior, 2017](#); [Kumawat et al., 2023](#); [Souza et al., 2016](#)). Nas bactérias, as bombas de efluxo desempenham um papel crucial na fisiologia e na defesa desses microrganismos, uma vez que são responsáveis por exportar uma ampla gama de substratos, incluindo antibióticos como fluoroquinolonas, tetraciclina e cloranfenicol. Além disso, podem eliminar corantes como brometo de etídio e acriflavina, bem como toxinas ([Garcia et al., 2022](#)).

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de mecanismo de resistência baseado na expressão de bomba de efluxo em amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas do leite de cabras com mastite subclínica.

Material e métodos

Foram avaliadas 95 amostras de espécies 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). Os isolados fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (UFape) e foram caracterizados em trabalhos anteriores ([Lima et al., 2015](#); [Silva et al., 2004](#)). Os isolados estavam criopreservados em freezer a -70° C e foram reativados em meio BHI (Brain Heart Infusion, Himedia, Índia) para as análises. O mecanismo de bomba de efluxo foi investigado utilizando-se metodologia baseada na capacidade das bactérias expulsarem o brometo de etídio (BrEt), proposta por [Ugwuanyi et al. \(2021\)](#), com modificações. Foram preparadas placas com Ágar Mueller-Hinton (KASVI, Espanha) contendo 0,5 mg/L de BrEt (Invitrogen, EUA.) e placas sem BrEt para controle negativo dos ensaios. 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° por 24 horas, quando realizou-se a leitura em transiluminador e o registro dos resultados. Para a interpretação dos dados foram considerados os critérios adotados por [Ugwuanyi et al. \(2021\)](#), em que amostras apresentando qualquer grau de brilho sob luz ultravioleta são consideradas negativas para bomba de efluxo e aquelas que não apresentam são consideradas positivas. Os dados foram tabulados e analisados em planilhas Excel®, calculando-se as frequências do mecanismo de resistência, de acordo com a espécie bacteriana avaliada.

Resultados e discussão

Do total de amostras bacterianas analisadas, 12 (12,6%) não demonstraram brilho quando expostas à luz ultravioleta, indicando a presença de algum tipo de bomba de efluxo que eliminou o corante para o meio extracelular. Por outro lado, 83 (87,4%) amostras apresentaram brilho e, portanto, foram consideradas negativas para a presença de bomba de efluxo.

A [tabela 1](#) demonstra os resultados observados para cada uma das espécies de SCN investigadas, destacando-se a espécie *S. capitis* subsp. *ureolyticus* com o maior percentual de positividade.

Tabela 1. Frequência absoluta e relativa de bomba de efluxo em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de mastite caprina

Espécie	Positiva		Negativa	
	F.A.*	F.R.**	F.A.*	F.R.**
<i>Staphylococcus chromogenes</i>	2	10,5	17	89,5
<i>Staphylococcus caprae</i>	2	11,0	16	89,0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	5,30	18	94,7
<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	5	25,0	15	75,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	10,5	17	89,5

*F.A. = frequência absoluta; **F.R. = frequência relativa

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos demonstrados em outros trabalhos ([Andrade, 2018](#); [França et al., 2012](#)). Estes autores, avaliando os padrões de resistência antimicrobiana em 210 amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite em pequenos ruminantes, observaram que 41 foram consideradas positivas para a presença de bomba de efluxo, representando 19,5% dos isolados investigados. Por outro lado, [Vieira et al. \(2024\)](#), avaliando 70 amostras bacterianas do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina, não detectaram bomba de efluxo em nenhum dos isolados. Ambos os autores utilizaram a mesma metodologia empregada neste estudo.

Considerando que as espécies de SCN são as mais frequentemente isoladas das mastites em caprinos, particularmente da forma subclínica, os resultados do presente estudo são preocupantes, visto que a expressão de um dado mecanismo de resistência por patógeno bacteriano sugere o uso incorreto de antibióticos em nível de fazenda, o que pode determinar o insucesso dos tratamentos a base desses fármacos. Além disso, alertam para o risco que representam os SCN, desde que as espécies desse grupo poderão transferir ativamente genes de resistência para a espécie *Staphylococcus aureus* ([Egyir et al., 2022](#)), considerada a mais patogênica do gênero *Staphylococcus* e associada a diversas doenças em humanos e outras espécies animais ([Easaw et al., 2022](#); [Jiang et al., 2023](#); [Zhu et al., 2024](#)).

Vale ressaltar que a bomba de efluxo é um fator de virulência que contribui para o aumento do potencial patogênico dos microrganismos. A expressão desse mecanismo 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 tetraciclinas e fluoroquinolonas, rotineiramente utilizados na terapêutica de mastite e outras doenças bacterianas em rebanhos leiteiros ([Pérez et al., 2020](#); [Zhang et al., 2024](#)). Esses sistemas podem transportar compostos específicos ou podem ser inespecíficos, transportando uma variedade de substratos estruturalmente diferentes, tais como as várias classes de antibióticos ([Ghotaslou et al., 2018](#)). Além disso, os sistemas de efluxo podem estar presentes juntamente com outros mecanismos de resistência antimicrobiana e fatores de virulência, tal como a produção de biofilmes, tornando limitado, difícil e oneroso o tratamento de infecções bacterianas ([Ugwanyi et al., 2021](#)).

Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que o mecanismo de resistência antimicrobiana mediado por bomba de efluxo está presente em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa. A presença desse mecanismo em isolados de mastite caprina sugere 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 bibliográficas

- Akter, S., Rahman, M. M., Sayeed, M. A., Islam, M. N., Hossain, D., Hoque, M. A., & Koop, G. (2020). Prevalence, aetiology and risk factors of subclinical mastitis in goats in Bangladesh. *Small Ruminant Research*, *184*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2020.106046>.
- Alves, B. F. C., Chaves, A. J. S., Vieira, N. F., Chaves, G. V., França, P. M., Barezani, A. S. A., & Soares, P. H. A. (2020). Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos usados no tratamento da mastite bovina: revisão. *PUBVET*, *14*(4), 1–6. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n4a557.1-6>.
- Andrade, F. M. (2018). Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. em mastite bovina - Revisão de literatura. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *53*(9).
- Brabes, K. C. S., Carvalho, E. P., Dionísio, F. L., Pereira, M. L., Garino, F., & Costa, E. O. (1999). Participação de espécies coagulase positivas e negativas produtoras de enterotoxinas do gênero *Staphylococcus* na etiologia de casos de mastite bovina em propriedades de produção leiteira dos Estados de São Paulo e Minas Gerais. *Revista Napgama*, *2*(3), 4–11.
- Calderón, G. R., & Ulate, L. A. (2017). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Medica de Costa Rica y Centroamerica*, *73*(621), 757–763.
- Costa, A. L. P., & Silva Júnior, A. C. S. (2017). Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, *7*(2), 45–57.
- Easaw, A. M., Vijayakumar, K., Davis, K. J., Shyma, V. H., & Surya, S. (2022). Molecular characterisation of virulence genes in *Staphylococcus aureus* associated with clinical bovine mastitis. *Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *53*(2). <https://doi.org/10.51966/jvas.2022.53.2.279-284>.
- Egyir, B., Dsani, E., Owusu-Nyantakyi, C., Amuasi, G. R., Owusu, F. A., Allegye-Cudjoe, E., & Addo, K. K. (2022). Antimicrobial resistance and genomic analysis of staphylococci isolated from livestock and farm attendants in Northern Ghana. *BMC Microbiology*, *22*(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02589-9>.
- Estrela, T. S. (2018). Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. *Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde*, *20*, 1998–2018.
- França, C. A., Peixoto, R. M., Cavalcante, M. B., Melo, N. F., Veschi, J. L. A., Mota, R. A., & Costa, M. M. (2012). Resistência antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. da mastite de pequenos ruminantes no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *32*(8), 747–753. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800012>.
- Garcia, Í. R., Garcia, F. A. O., Pereira, P. S., Coutinho, H. D. M., Siyatpanah, A., Norouzi, R., Wilairatana, P., Pereira, M. L., Nissapatorn, V., Tintino, S. R., & Rodrigues, F. F. G. (2022). Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sciences*, *295*, 120391. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120391>.
- Ghotaslou, R., Yekani, M., & Memar, M. Y. (2018). The role of efflux pumps in *Bacteroides fragilis* resistance to antibiotics. *Microbiological Research*, *210*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.02.007>.
- Jesus, R. A., & Coutinho, C. A. (2018). Uso de medicamentos homeopáticos para o tratamento da mastite bovina: Revisão. *PUBVET*, *12*(3), 1–10. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n3a58.1-10>.
- Jiang, J. H., Cameron, D. R., Nethercott, C., Aires-De-Sousa, M., & Peleg, A. Y. (2023). Virulence attributes of successful methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, *36*(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00148-22>.
- Koop, G., van Werven, T., Schuiling, H. J., & Nielen, M. (2010). The effect of subclinical mastitis on milk yield in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, *93*(12), 5809–5817. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3544>
- Kumawat, M., Nabi, B., Daswani, M., Viqar, I., Pal, N., Sharma, P., Tiwari, S., Sarma, D. K., Shubham, S., & Kumar, M. (2023). Role of bacterial efflux pump proteins in antibiotic resistance across microbial species. *Microbial Pathogenesis*, *181*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106182>.

- Lima, T. C., Ferreira, C. E. R., Moraes, A. C. A., Vilaça, L. F., Batissta, A. M. V., & Silva, E. R. (2015). Perfil de resistência antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de mastite caprina. *Ciência Veterinária Nos Trópicos*, *18*, 319–322.
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., & Zaragoza-Bastida, A. (2023). Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches. *Veterinary and Animal Science*, *21*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100306>.
- Naranjo-Lucena, A., & Slowey, R. (2023). Invited review: Antimicrobial resistance in bovine mastitis pathogens: A review of genetic determinants and prevalence of resistance in European countries. *Journal of Dairy Science*, *106*(1), 1–23. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22267>.
- Paim, J. B., Fraga, D. da R., Libardoni, F., Possebon, C. F., Bernardi, K. D. C., Favaretto, M., & Kinalski, G. da S. (2020). Avaliação de tratamento homeopático na prevalência da mastite bovina. *PUBVET*, *14*(11), 1–5. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n11a691.1-5>
- Pérez, V. K. C., Costa, G. M., Guimarães, A. S., Heinemann, M. B., Lage, A. P., & Dorneles, E. M. S. (2020). Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *22*, 792–802. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>.
- Santos, L. L., Costa, G. M., Pádua Pereira, U., Silva, M. A., & Silva, N. (2011). Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus* coagulase-negativa. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, *70*(1), 1–7.
- Scaldaferri, L. G., Tameirão, E. R., Flores, S. A., Neves, R. A. S. C., Correia, T. S., Carmo, J. R., Toma, H. S., & Ferrante, M. (2020). Formas de resistência microbiana e estratégias para minimizar sua ocorrência na terapia antimicrobiana: Revisão. *PUBVET*, *14*(8), 1–10. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v14n8a621.1-10>.
- Silva, E. R., Siqueira, A. P., Martins, J. C. D., Ferreira, W. P. B., & Silva, N. (2004). Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research*, *55*(1–3), 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.01.001>.
- Silva, R. A., Oliveira, B. N. L., Silva, L. P. A., Oliveira, M. A., & Chaves, G. C. (2020). Resistência a antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. *Saúde em Debate*, *44*(126), 607–623. <https://doi.org/10.1590/0103-1104202012602>.
- Souza, M. M. S., Coelho, S. M. O., Coelho, I. C., Soares, B. S., Motta, C. C., Melo, D. A., Dubenczuk, F. C., Santiago, G. S., Pimenta, R. L., & Marques, V. F. (2016). Resistência antimicrobiana em animais de produção: uma visão geral. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, *38*(Supl. 3), 68–74.
- Spaulding, C. N., Klein, R. D., Schreiber, H. L., Janetka, J. W., & Hultgren, S. J. (2018). Precision antimicrobial therapeutics: The path of least resistance? *Npj Biofilms and Microbiomes*, *4*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0048-3>.
- Suwito, W., Nugroho, W. S., Wahyuni, A. E. T. H., & Sumiarto, B. (2021). Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci isolated from subclinical mastitis in Ettawa crossbred goat (Pe) in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas*, *22*(6), 3418–3422. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220650>.
- Tangorra, F. M., Zaninelli, M., Costa, A., Agazzi, A., & Savoini, G. (2010). Milk electrical conductivity and mastitis status in dairy goats: Results from a pilot study. *Small Ruminant Research*, *90*(1–3), 109–113. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.02.006>
- Ugwuanyi, F. C., Ajayi, A., Ojo, D. A., Adeyemi, A. I., & Smith, S. I. (2021). Assessment of efflux pump activity and biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Federal Medical Center in Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, *11*. <https://doi.org/10.1186/s12941-021-00417-y>.
- Vieira, J. C. S., Araújo, K. L., Santos, A. C. N., Sá, H. S. T., Leite, A. E. L. M., Mendonça, M., & Silva, E. R. (2024). Prevalência de mastite e caracterização de agentes bacterianos isolados de rebanhos leiteiros da microrregião de Garanhuns, estado de Pernambuco, Brasil. *Acta Veterinaria Brasilica*, *18*(1), 44–53. <https://doi.org/10.21708/avb.2024.18.1.11961>.

Wang, W., Weng, Y., Luo, T., Wang, Q., Yang, G., & Jin, Y. (2023). Antimicrobial and the resistances in the environment: Ecological and health risks, Influencing factors, and mitigation strategies. *Toxics*, *11*(2). <https://doi.org/10.3390/toxics11020185>.

Zhang, L., Tian, X., Sun, L., Mi, K., Wang, R., Gong, F., & Huang, L. (2024). Bacterial efflux pump inhibitors reduce antibiotic resistance. *Pharmaceutics*, *16*(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020170>.

Zhu, L., Lai, Y., Ma, H., Gong, F., Sun, X., Cao, A., Jiang, T., Han, Y., & Pan, Z. (2024). Molecular and epidemiological characterization of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in China. *Pharmaceutics*, *16*(2), 106640. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106640>.

Histórico do artigo:

Recebido: 16 de janeiro de 2025

Aprovado: 3 de fevereiro de 2025

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.