



DESEMPENHO *IN VITRO* DO DORIPENEM CONTRA *Staphylococcus aureus* MULTIRRESISTENTES ISOLADOS DE MASTITES

L. S. Batista¹, M. E. F. Gonçalves², L. P. Barros³, H. G. Lima⁴, R. C. S. Conceição⁵, P. S. Nascente⁶

1- Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 99909-7213 – e-mail: lbatistasul@gmail.com.

2- Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (51) 99179-1312 – e-mail: eduardafortes.ma@gmail.com

3 - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (51) 99909-7213 – e-mail: lpdebarros@gmail.com.

4- Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 99981-2614 – e-mail: helenicegonzalez@hotmail.com

5- Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 98100-6945 – e-mail: ritinhaconceicao@hotmail.com

6- Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas – CEP: 96160-000 – Pelotas – RS – Brasil, Telefone: (53) 98144-9870 – e-mail: pattsn@gmail.com

RESUMO – *Staphylococcus aureus* é um importante agente etiológico de mastites no sul do Rio Grande do Sul (RS). Quando presente em altas concentrações nos alimentos produz toxinas termoestáveis, portanto resistentes ao tratamento térmico dado à matéria-prima, capazes de levar o consumidor a uma intoxicação alimentar. Ao mesmo tempo é uma bactéria considerada de alto interesse para multirresistência pela Organização Mundial de Saúde (OMS). O Doripenem é o antimicrobiano mais moderno pertencente a classe dos carbapenêmicos, entretanto estudos anteriores demonstraram eficácia limitada contra *S. aureus* resistentes à metilicina (MRSA) isolados de seres humanos. O presente estudo buscou verificar o desempenho do Doripenem *in vitro* contra *S. aureus* isolados de mastites bovinas do sul do RS através de antibiograma pela técnica de discos de difusão de Kirby-Bauer. Foi observado que tanto *S. aureus* sensíveis à metilicina (MSSA), quanto MRSA formaram halos de inibição, entretanto houve diferença estatisticamente significativa entre MSSA e MRSA.

ABSTRACT – *Staphylococcus aureus* is an important etiological agent of infectious mastitis in the south of Rio Grande do Sul State/Brazil (RS). When present in high concentrations, it can produce thermostable toxins, therefore resistant to heat treatment given to the raw material. These toxins cause food poisoning to the consumer. At the same time, this bacteria is considered of high interest for multidrug resistance by the World Health Organization (WHO). Doripenem is the most modern antimicrobial belonging to the carbapenem class, however previous studies have shown limited efficacy against methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from humans. The aim of this study was to verify the performance of Doripenem *in vitro* against *S. aureus* isolated from bovine mastitis in the south of RS by antibiogram, using the Kirby-Bauer disk diffusion. It was observed that methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA) and MRSA



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

formed inhibition zones, however there was a statistically significant difference between MSSA and MRSA.

PALAVRAS-CHAVE: antibiograma; qualidade do leite; microbiologia, produção leiteira.

KEYWORDS: antibiogram; milk quality; microbiology; dairy production.

1. INTRODUÇÃO

Mastite é a inflamação da glândula mamária, sendo os principais agentes etiológicos as bactérias, de acordo com Santos e Fonseca (2019). A severidade dos quadros variam desde alterações no leite dos quartos mamários acometidos, a condições sistêmicas graves que podem evoluir para o óbito do animal. Invariavelmente a mastite cursa com alterações no leite, as quais diminuem a qualidade da matéria-prima, seja através da elevação da Contagem de Células Somáticas (CCS), seja através de alterações físico-químicas. Um importante agente causador de mastites contagiosas é a bactéria *Staphylococcus aureus*, de acordo com Bandeira et al (2013) 17,6% das mastites subclínicas da região sul do Rio Grande do Sul são causadas por *S. aureus*.

S. aureus além de causar prejuízos econômicos ao produtor, tem potencial para gerar agravos à saúde pública, visto que quando em altas quantidades no alimento, pode produzir toxinas termoestáveis, ou seja, resistentes ao tratamento térmico dado à matéria-prima nas unidades de beneficiamento, cujo consumo leva à intoxicação alimentar, conforme Abril *et al.* (2020).

S. aureus é uma bactéria atualmente considerada de alta prioridade pela OMS (Organização Mundial de Saúde) (2024) para multirresistência. O Doripenem, é um antibiótico de amplo espectro, da classe dos carbapenêmicos, sendo a mais nova molécula da classe. Segundo Fritsche et al. (2005), ele demonstra eficácia contra *S. aureus* entretanto, o estudo de Lascols *et al* (2011) demonstrou que havia pouca eficácia *in vitro* do Doripenem contra *S. aureus* resistentes à Meticilina (MRSA) isolados de pessoas. O objetivo deste trabalho é verificar o desempenho do Doripenem, *in vitro*, frente a isolados de *S. aureus* multirresistentes de mastites bovinas, de rebanhos do sul do Rio Grande do Sul (RS), avaliando seu desempenho em isolados de mastite de MRSA e sensíveis à Meticilina (MSSA).



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados

Para o presente trabalho foram selecionados 15 isolados de *S. aureus* multirresistentes, de um total de 102 isolados de *S. aureus* que compõe o banco de isolados do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Os isolados foram obtidos de amostras de leite de vacas com mastite, pertencentes a rebanhos comerciais, coletadas em propriedades leiteiras da região sul do Rio Grande do Sul, seguindo o modelo de Dal Vesco *et al.* (2017). As técnicas de diagnóstico microbiológico do agente etiológico das mastites seguem Santos e Fonseca (2019) e Zafalon *et al.* (2009). Isolados de *S. aureus* foram submetidos a antibiograma pela técnica de discos de difusão de Kirby-Bauer, conforme o CLSI (2024). Aqueles isolados que apresentam algum grau de resistência a três classes distintas de antimicrobianos são considerados multirresistentes, conforme a OMS (2024). Os procedimentos de coleta ocorreram através de projetos de pesquisa, e foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas (CEUA/UFPEL) sob o número 021682/2024-28.

2.2 Recuperação dos Isolados Multirresistentes e Teste *in vitro* do desempenho de Doripenem

Para reativação dos isolados congelados, uma alíquota de 0,1ml dos estoques foi adicionada a 3ml de caldo Infusão-Cérebro-Coração (caldo BHI Kasvi) e incubada à 37°C por 24 horas, conforme Silva *et al.* (2017) Posteriormente, uma alíquota de 10mcg do caldo foi semeada em placas contendo Ágar Baird-Parker (Kasvi) enriquecido a 1% com Telurito de Potássio e emulsão de gema de ovo à 5%, previamente submetidas ao controle de esterilidade, e incubadas à 37°C por 24 horas, a fim de verificar a viabilidade e pureza dos isolados. Os isolados foram então repicados em Ágar Padrão de Contagem (PCA, Kasvi), por ser um meio nutritivo, não cromogênico e não seletivo conforme sugere Ribeiro e Stelato (2011) e incubadas à 37°C por 18 horas. Para verificação do desempenho *in vitro* do Doripenem, dissolveu-se o isolado do meio sólido em solução-salina à 0,85% em 0,5 na escala de McFarland, utilizando-se o aparelho Densichek para verificação da densidade óptica, e realizou-se o antibiograma, pela técnica de discos de difusão, conforme Ribeiro e Stelato (2011). Para cada isolado, o procedimento de antibiograma foi realizado três vezes, para obtenção de triplicata.



2.3 Análise Estatística

Para análise estatística dos dados considerou-se uma unidade experimental cada placa de antibiograma. Cada isolado teve três placas A, B e C, correspondentes às três repetições. Utilizou-se a Análise de Variância de um critério (ANOVA One-way) de delineamento experimental inteiramente casualizado, a fim de verificar se houve diferença estatística entre o tamanho do halo de inibição dos isolados. Os resultados obtidos no teste de Fisher (teste F) indicaram diferença estatística entre os isolados ($p < 0,05$). Dessa forma, realizou-se o teste Tukey com nível de significância de 5% para comparação das médias. Os cálculos foram realizados através do programa Bioestat 5.0. Nas placas onde houve o crescimento de colônias satélite, dentro do halo de inibição, considerou-se o halo de inibição nulo, atribuindo-se o valor 0, ao mesmo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os isolados de *S. aureus* estocados que apresentaram multirresistência são Sta2, Sta20, Sta48, Sta49, Sta52, Sta110, Sta125, Sta187, Sta264, Sta265, Sta272, Sta320, Sta331, Sta343 e Sta347. Todos foram selecionados para a pesquisa. Os isolados Sta2 e Sta20 são MRSA, pois são resistentes à Oxacilina, conforme o CLSI (2024), e resistentes à Cefoxitina. Sta2 e Sta20 são resistentes ao Ertapeném, sendo que Sta20 é também resistente ao Meropenem. Todos os isolados são sensíveis ao Imipeném. Os demais isolados, apesar de multirresistentes, são sensíveis à Oxacilina e à Cefoxitina.

Todos os isolados incluídos apresentaram crescimento e formação do halo de nas três repetições: A, B e C. O isolado Sta20, que é MRSA, apresentou uma colônia satélite, dentro do halo, na repetição B sendo por isso considerado resistente. Os resultados do tamanho dos halos de inibição estão na tabela 1.

TABELA 1 - Tamanho do halo de inibição (em milímetros) do Doripenem obtido em antibiograma pela técnica de discos de difusão com isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes de mastite bovina em três repetições: A, B e C.

Identificação do Isolado	Resistência à Oxacilina	Repetição A (mm)	Repetição B (mm)	Repetição C (mm)	Tamanho médio do Halo de Inibição e comparativo das médias à $p < 0,05$
Sta 2	MRSA	27	26	25	26a
Sta 20	MRSA	29	Resistente	30	20a
Sta 48	MSSA	40	40	43	41b
Sta 49	MSSA	46	43	45	45b



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

Sta 52	MSSA	40	40	40	40b
Sta 110	MSSA	40	39	41	40b
Sta 125	MSSA	40	40	43	41b
Sta 187	MSSA	41	45	49	45b
Sta 264	MSSA	46	45	47	46b
Sta 265	MSSA	46	47	48	47b
Sta 272	MSSA	43	43	39	42b
Sta 320	MSSA	42	43	42	42b
Sta 331	MSSA	41	41	41	41b
Sta 343	MSSA	41	40	39	40b
Sta 347	MSSA	46	42	41	43b

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina; MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à Meticilina

Os menores halos de inibição foram dos isolados Sta2 e Sta20. A análise estatística mostrou diferença significativa a $p < 0,05$ entre os isolados MRSA com todos os demais, que são sensíveis à meticilina. Não houve diferença significativa entre o Sta2 e Sta20, nem entre os demais, ou seja, a diferença se deu devido à resistência à meticilina.

Os dados observados neste trabalho corroboram com Lascols *et al.* (2011), de que há diferença *in vitro* da eficácia de Doripenem entre MSSA e MRSA. Da mesma forma, corrobora com a recomendação do BrCAST (2024) de que a sensibilidade ao Doripenem para *S. aureus* seja verificada através da sensibilidade à Cefoxitina, uma vez que os isolados com menor halo de inibição também foram resistentes à Cefoxitina, e isolados com maior halo de inibição foram sensíveis à Cefoxitina.

4. CONCLUSÕES

A partir do presente estudo, verificou-se que o Doripenem apresentou desempenho *in vitro* significativamente menor para MRSA isolados de mastite, comparado com MSSA. Esse resultado vai ao encontro dos resultados encontrados na literatura a partir de testes feitos a partir de *S. aureus* isolados de humanos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



19 A 21 DE MAIO DE 2025 | BENTO GONÇALVES | RS

ABRIL, A. G., VILLA, T. G., BARROS-VELÁZQUEZ, J., CAÑAS, B., SÁNCHEZ-PÉREZ, A., CALO-MATA, P., CARRERA, M. *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. **Toxins**, v. 12, p. 2, 2020.

BANDEIRA, F. S.; PICOLI, T.; ZANI, J. L.; SILVA, W. P.; FISCHER, G.; Frequência de *Staphylococcus aureus* em casos de mastite bovina subclínica, na região sul do Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.1, p.1-6, 2013;

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - BrCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Versão de 13/04/2024;

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 34th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2024.

DAL VESCO, J; SIEBEL, J. C.; SUZIN, G. O.; CERESER, N. D.; GONZALEZ, H. L.; Monitoramento dos agentes causadores de mastite e a susceptibilidade aos antimicrobianos. **Expressa Extensão**, v. 22, n.1, p.34-50, 2017.

FRITSCHKE, T. R., STILWELL, M. G., JONES, R. N. Antimicrobial activity of doripenem (S-4661): a global surveillance report (2003). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, n. 12, p. 1, 2005.

LASCOLS, C.; LEGRAND, P.; MÉRENS, A.; LECLERCQ, R.; ARMAND-LEFEVRE, L.; DRUGEON, H. B.; KITZIS, M. D.; MULLER-SERIEYS, C.; REVERDY, M. E.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; MOUBARECK, C.; LEMIRE, A.; MIARA, A.; GJOKLAJ, M.; SOUSSY, C.-J.; In vitro antibacterial activity of doripenem against clinical isolates from French teaching hospitals: proposition of zone diameter breakpoints. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p.475-482, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS. WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health. Genebra, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>. Acesso em janeiro de 2025.

RIBEIRO, M. C.; STELATO, M. M.; **Microbiologia Prática - Aplicações de Aprendizagem de Microbiologia Básica - Bactérias, Fungos e Vírus** (2ª Edição). São Paulo: Atheneu, 2011.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L.; **Controle de Mastite e Qualidade do Leite - Desafios e Soluções**. Pirassununga: Edição dos Autores, 2019, 301p.;

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M.; **Manual de Análise Microbiológica de alimentos e água**. (5ª Edição). São Paulo: Blucher, 2017.

ZAFALON, L. F.; ARCARO, J. R. P.; FILHO, A. N.; FERREIRA, L. M.; Utilização do Teste de Voges-Proskauer e da Coagulase para o Diagnóstico Laboratorial de *Staphylococcus aureus* Envolvidos na Epidemiologia da Mastite Bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, p.1285-1293, 2009.