

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

PERFIL MICROBIOLÓGICO DO LEITE BOVINO ANALISADO NO LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA DA UNIJUI¹

**Tassiéli Senger Kaiser², Karine Fernandes Possebon³, Samuel Zulianello Grazziotin⁴,
Luciana Mori Viero⁵, Luciane Ribeiro Viana Martins⁶.**

¹ Título do projeto desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI.

² Bolsista PROBIC/FAPERGS Graduanda do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, tassiel.kaiser@hotmail.com

³ Bolsista PIBIC/UNIJUI Colaboradora do Projeto de Pesquisa Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, Karineposebon_4@hotmail.com

⁴ Colaborador do Projeto de Pesquisa Graduando do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, samuel.grazziotin@gmail.com

⁵ Professora Coordenadora do Projeto de Pesquisa, luciana.viero@unijui.edu.br

⁶ Professora Coordenadora e orientadora do Projeto de Pesquisa, luciane.viana@unijui.edu.br

Introdução

De acordo com Harmon (1994) a mastite é a inflamação da glândula mamária que ocorre em resposta à invasão por microrganismos patogênicos (OKURA, RIGOBELLO, ÁVILA, 2005). Apresenta etiologia complexa e multivariada, tornando-se necessária a identificação dos microrganismos infectantes para o controle, prevenção, além da implantação de métodos de tratamento e estratégias de controle e profilaxia adequados (DIAS, 2007). Após a cultura e isolamento do patógeno, é essencial a realização do antibiograma para detectar a sensibilidade do microrganismo frente aos antibióticos. Essa análise auxilia na escolha do medicamento mais apropriado para tratamento das mastites, e reduz o risco de aquisição de resistência dos agentes patogênicos frente aos antimicrobianos (BRITO et al, 2001).

Os objetivos deste trabalho foram identificar os gêneros e as espécies bacterianas causadoras da mastite bovina na região Noroeste do Rio Grande do Sul e determinar o perfil de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos.

Metodologia

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI (LAMIVET) a partir do recebimento de amostras de leite da região.

As análises laboratoriais seguiram os critérios de identificação fenotípica descritos por Becton Dickinson (1984) e Mc Faddin (1980). Após a identificação da espécie, foi realizado o antibiograma frente aos seguintes antimicrobianos: ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 UI) e tetraciclina (30 µg), baseando-se na técnica da difusão em ágar segundo Bauer, et al. (1966), finalizando os testes.

Resultados e discussão

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Foram analisadas 459 amostras de leite provenientes de 19 municípios da região do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, obtendo-se 381 culturas microbiológicas distintas e em 106 cultivos, ausência de microrganismos, conforme mostra a figura 1.

Os agentes etiológicos com maior ocorrência nas amostras de leite analisadas foram *Staphylococcus aureus* (22,05%) *Streptococcus uberis* (13,65%), *Corynebacterium* spp. (12,07%), *Enterobacter* spp. (8,14%), *Staphylococcus intermedius* (6,11%) e *Escherichia coli* (6,04%).

Os patógenos envolvidos com a mastite são classificados como contagiosos e ambientais. De acordo Bradley (2002), os microrganismos contagiosos estão adaptados a sobreviver no organismo do hospedeiro, os quartos mamários infectados servem de reservatório da bactéria, e a doença se manifesta quando ocorre a transferência deste agente para uma glândula mamária sadia, isso ocorre por meio do equipamento de ordenha contaminado, bezerro lactente ou mãos do ordenhador. Neste caso, os principais agentes envolvidos são *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Staphylococcus intermedius* (RADOSTITS et al., 2010).

Segundo Bradley (2002) os patógenos ambientais atuam como invasores oportunistas da glândula mamária e não são adaptados a sobreviver no hospedeiro. Esses patógenos vivem preferencialmente no habitat da vaca, em locais que apresentam esterco, urina, barro e camas orgânicas. Os principais microrganismos desse tipo de infecção são as bactérias gram-negativas principalmente *Enterobacteriaceae* como *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Enterobacter* (*Streptococcus uberis* e menos frequente *Streptococcus dysgalactiae*) e *Enterococos* (*Enterococcus faecalis*) (GRUET et al., 2001).

Quanto ao perfil de sensibilidade in vitro aos antimicrobianos, foram avaliados os antibiogramas dos agentes etiológicos com maior ocorrência nas amostras de leite analisadas no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUÍ. Dessa forma, foram mais significativas as amostras contendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium* spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus intermedius* e *Escherichia coli*.

A porcentagem de sensibilidade dessas bactérias frente aos antibióticos ampicilina, cefalotina, eritromicina, penicilina e tetraciclina estão distribuídas na figura 2.

De acordo com a tabela, os antimicrobianos mais eficazes para o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus intermedius* foram a tetraciclina (79% e 78%) e cefalotina (78% e 74%) e os antibióticos menos eficazes foram ampicilina (56% e 55%), penicilina (45% e 40%) e eritromicina (29% e 22%).

Os antibióticos beta-lactâmicos como ampicilina e penicilina, assim chamados por apresentarem um anel beta-lactâmico na molécula, e são inativadas por enzimas denominadas lactamases.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Praticamente 100% das amostras de *Staphylococcus aureus* e por volta de 80% das outras linhagens de *Staphylococcus* são produtoras desta substância, por esse motivo não são recomendados para tratamento das mastites causadas por esses agentes etiológicos. As penicilinas antiestafilocócicas como as cefalosporinas de primeira (cefalotina) e segunda geração são recomendadas, pois combatem os estafilococos (SPINOSA et al. 2011).

Em um estudo feito por Oliveira et al. (2011) dos isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivo (*S. aureus* e *S. intermedius*), 93% foram sensíveis à tetraciclina e 86% sensíveis à cefalotina e menos sensíveis a ampicilina (40%), penicilina (27%) e eritromicina (33%), obtendo resultados muito semelhantes a presente pesquisa.

Em relação a isso, de acordo com Freitas et al. (2005) os testes de sensibilidade in vitro permitem identificar os estafilococos sensíveis às penicilinas, podendo assim, serem recomendadas no tratamento in vivo das mastites antes de sugerir um medicamento de última geração. Os patógenos deste gênero isolados no LAMIVET demonstraram baixa sensibilidade a antibióticos beta-lactâmicos, desta forma, não seria indicado à utilização destes princípios ativos no tratamento de mastites causadas por esses agentes, sendo mais adequada a eleição de outro medicamento antimicrobiano.

Dos antibióticos testados para *Streptococcus uberis*, a cefalotina (61%) e a tetraciclina (62%) mostraram-se mais eficazes, enquanto ocorreu menor sensibilidade a ampicilina (49%), eritromicina (52%) e penicilina (51%). Na pesquisa desenvolvida por Oliveira et al. (2011) foi encontrado um perfil de sensibilidade dos *Streptococcus* spp. de 50 % frente a ampicilina, eritromicina e penicilina, compatível aos resultados obtidos nesta investigação, demonstrando multirresistência do agente a antimicrobianos.

Nenhum dos antibióticos testados para *Enterobacter* spp. e *Escherichia Coli* revelou-se totalmente eficaz. Conforme Zee e Hirsh (2009), as enterobactérias são sensíveis a um largo espectro de antimicrobianos, mas sua sensibilidade pode mudar rapidamente por meio da aquisição de plasmídeos de resistência. Nas amostras de *Escherichia coli* analisadas por Bonora e Rossi (2015) no extremo oeste de Santa Catarina, foi descrito baixa sensibilidade para ampicilina (0%) e alta sensibilidade à tetraciclina (83%), neste sentido, as amostras de enterobactérias isoladas no Noroeste do estado do Rio Grande do Sul apresentaram resistência a todos antimicrobianos testados, este pode ser indicativo da ampla disseminação patógenos causadores de mastite na região, que apresentam variada aquisição de plasmídeos de resistência.

O antimicrobiano tetraciclina (63%) apresentou a maior porcentagem sensibilidade no teste in vitro para a espécie *Corynebacterium* spp., enquanto o restante dos antimicrobianos testados não demonstraram porcentagem de sensibilidade satisfatória. Oliveira et al. (2011) em seu trabalho descreve alta resistência da bactéria a penicilina e ampicilina, os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados nessa pesquisa. Segundo Zee e Hirsh (2009) o gênero

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Corynebacterium apresenta sensibilidade a penicilinas, eritromicina e tetraciclina, resultado que difere dos encontrados neste estudo.

A ampla utilização de medicamentos antimicrobianos de forma indiscriminada, contribui para aquisição de resistência por parte dos microrganismos, dentro deste contexto, enfatiza-se a importância da identificação dos microrganismos presentes no leite bovino para realização de antibiograma, determinando assim sua sensibilidade frente aos antibióticos para que estes sejam utilizados de forma correta.

Conclusão

A partir das amostras analisadas identificaram-se gêneros de bactérias causadoras de mastite contagiosa e mastite ambiental, que apresentaram ampla resistência *in vitro*, por parte dos microrganismos, aos antimicrobianos testados. Sendo que o *S. aureus*, o *S. intermedius* e o *Streptococcus uberis* demonstraram, em diferentes graus, baixa sensibilidade a eritromicina, penicilina e ampicilina. As cepas isoladas de *Enterobacter* spp. e *Escherichia Coli*, não demonstraram sensibilidade satisfatória a nenhum dos antimicrobianos que foram testados, evidenciando a elevada aquisição de plasmídeos de resistência. Já as bactérias isoladas do gênero *Corynebacterium* spp., demonstraram sensibilidade *in vitro* satisfatória apenas a tetraciclina.

Com tais resultados, é possível enfatizar a grande importância de se realizar a identificação dos agentes etiológicos das mastites através da cultura e isolamento, e após isso, submeter os microrganismos isolados ao teste de sensibilidade *in vitro*, identificando assim, quais princípios ativos são efetivos contra a bactéria, evitando a ampla utilização de princípios ativos de forma errônea e indiscriminada, que favorecem a aquisição de resistência aos antimicrobianos por parte dos microrganismos, que hoje em dia já é uma realidade extremamente preocupante da área Veterinária.

Palavras-chave: rebanho leiteiro, microrganismo, mastite, prejuízo econômico.

Referências bibliográficas

- BAUER, A. W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, n.4, p.493-496, 1966.
- BECTON DICKINSON and COMPANY. Manual DIFCO. Ed. Detroit, 1984.
- BEURON, D. C. Prevalência e Susceptibilidade Antimicrobiana de Patógenos Causadores de Mastite em Rebanhos Leiteiros. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia, 2012.
- BONORA, J. e ROSSI, E. M Avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* isolados de leite de bovinos com mastite no extremo Oeste de Santa Catarina. Programa de bolsas universitárias de Santa Catarina – UNIEDU, 2015.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an envolving disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRITO, M. A. V. P., et al. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.53, n.5, p.531-537, 2001.
- DIAS, R. V. da C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinária Brasília*, v.1, n.1, p.23-27, 2007.
- 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.*, São Paulo, v.72, n.2, p.171-177, abr./jun., 2005.
- GRUET, P.; et al. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 50, n. 3, p. 245-259, 2001.
- HARMON, R. J. Physiology of mastites and factors affecting somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 2103-2112, 1994.
- Mc. FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
- OKURA, M. H.; RIGOBELLO, E. C.; ÁVILA, F. A. Isolamento e identificação de patógenos em leite cru produzido nas microrregiões do Triângulo Mineiro, MG. *ARS Veterinária*, Jaboticabal (SP), vol. 21, nº 3, 324-331, 2005.
- OLIVEIRA C.M.C. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 2, p. 104-110, 2011.
- RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5ª ed. 2011..
- ZEE, Y. C. e HIRSH, D. C. *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro – RJ: Guanabara Koogan, 2009.

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIII Seminário de Iniciação Científica

Gráfico 1. Percentual dos agentes etiológicos encontrados na análise de leite da região Noroeste do RS. LAMIVET, UNIJUI, 2012-2015.

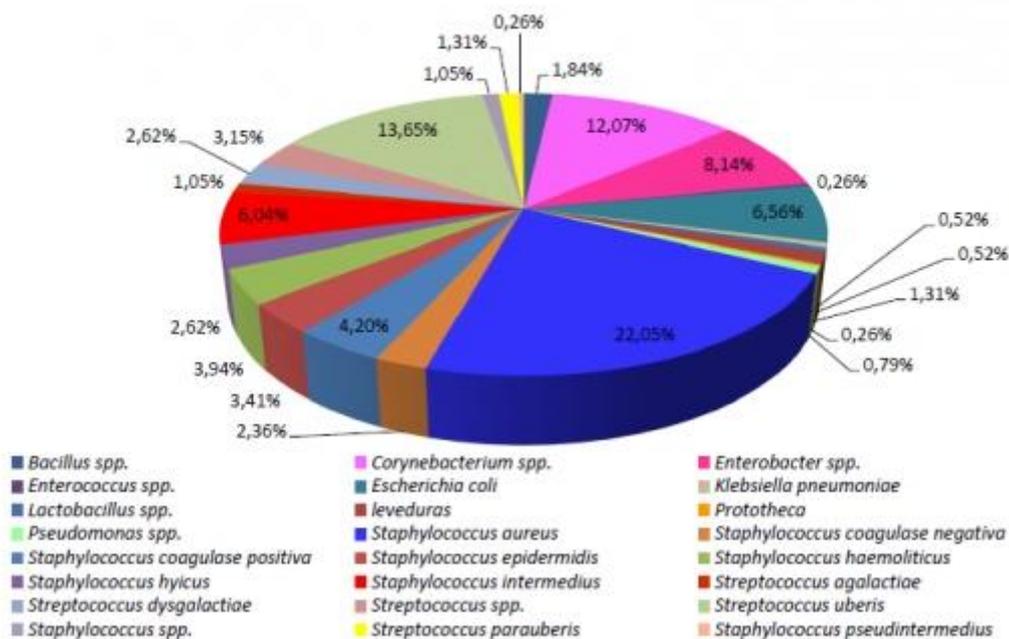


Figura 1.

Tabela 1. Porcentagem de sensibilidade dos agentes etiológicos com maior ocorrência nas amostras de leite frente aos antimicrobianos. LAMIVET, UNIJUI, 2012-2015.

| AGENTE ETIOLÓGICO | ANTIMICROBIANOS | | | | |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | AMP ¹ | CFL ² | PEN ³ | TET ⁴ | ERI ⁵ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 56% | 78% | 45% | 79% | 29% |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 49% | 61% | 51% | 62% | 52% |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | 40% | 50% | 32% | 63% | 29% |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | 55% | 74% | 40% | 78% | 22% |
| <i>Enterobacter spp.</i> | 39% | 37% | 10% | 47% | 20% |
| <i>Escherichia Coli</i> | 18% | 13% | 0% | 36% | 0% |

Ampicilina¹, Cefalotina², Penicilina³, Tetraciclina⁴, Eritromicina⁵.

Figura 2.