

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

PREVALÊNCIA E SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS DO GÊNERO CORYNEBACTERIUM SP. NO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL¹
PREVALENCE AND SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIALS OF BACTERIA OF THE GENUS CORYNEBACTERIUM SP. IN THE NORTHWEST OF THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL

Gabriela Mignoni Amarante², Bruna Carolina Ulsenheimer³, Silvana Konageski Dalla Rosa⁴, Luciane Ribeiro Viana Martins⁵

¹ Projeto de Pesquisa de Iniciação Científica do curso de Medicina Veterinária, Grupo de Pesquisa de Produção e Bem Estar Animal, Departamento de Estudos Agrários da UNIJUI;

² Graduanda do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, bolsista voluntária PIBIC/UNIJUI;

³ Graduanda do curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, bolsista PIBIC/UNIJUI;

⁴ Funcionária do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI, Colaboradora do trabalho;

⁵ Doutora do Departamento em Estudos Agrários, Curso de Medicina Veterinária da UNIJUI, Professora Orientadora.

INTRODUÇÃO

A mastite bovina é uma das principais afecções do rebanho leiteiro mundial, principalmente em rebanhos de animais de alta produção. Esta doença caracteriza-se por ser uma inflamação da glândula mamária, comumente oriunda de processo infeccioso (BARBALHO & MOTA, 2001).

É classificada de acordo com o microrganismo infeccioso em mastite ambiental quando causada por agentes pertencentes ao ambiente e mastite contagiosa quando causada por agentes que tem por habitat o interior ou a superfície da pele dos tetos. Também pode ser caracterizada conforme a evolução clínica em mastite clínica, onde os sinais clínicos na glândula mamária e alterações visíveis no leite são perceptíveis, e mastite subclínica onde os sinais clínicos e as alterações no leite não são observadas ao exame físico, podendo ser diagnosticada apenas através de exames complementares (SAAB *et al.*, 2014).

A contaminação da glândula mamária bovina poderá ocorrer devido aos maus hábitos de higiene na ordenha, contaminação dos equipamentos de ordenha, contato com a pele da mão do ordenhador quando não higienizada ou através da contaminação no ambiente onde vive este animal (SAAB *et al.*, 2014).

Quando a mastite for derivada da contaminação ambiental, na maioria das vezes irá apresentar sinais evidentes de inflamação no úbere, tais como edema, calor, rubor e sensibilidade dolorosa ao toque. Também se evidenciam alterações nas características físicas do leite exemplificadas por variações de cor, consistência e presença de grumos (RIBEIRO *et al.*, 2003). Os principais agentes etiológicos isolados de casos de mastite ambiental são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus uberis*, *Enterobacter aerogenes*, *Nocardia sp.* e *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA *et al.*, 2010).

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

Mastites contagiosas geralmente não irão apresentar manifestações clínicas evidentes, porém poderão ocorrer significativas alterações na composição natural do leite e uma importante diminuição na quantidade do leite produzido. Este tipo de mastite tem maior importância devido a sua ação silenciosa pela inexpressividade de sinais clínicos e também pela baixa qualidade do leite produzido (RIBEIRO *et al.*, 2003). Segundo Silva *et al.* (2010) os principais microrganismos ligados a esta categoria são *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Staphylococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Corynebacterium bovis*.

Bactérias do gênero *Corynebacterium* podem apresentar-se de diferentes formas clínicas aos seres vivos: patogênicas, aqueles com potencial para causar doenças e não patogênicas, aquelas que não causam enfermidades e podem, inclusive, serem usadas para fins benéficos. (BUENO, 2003).

Dentro do gênero *Corynebacterium sp.*, a *C.bovis* possui o maior índice de prevalência em casos de mastite. Durante muito tempo acreditou-se que o mesmo possuía ação protetora da glândula mamária contra outros agentes, porém, relatos indicam a presença da espécie em tecidos mais profundos da glândula, confirmando seu potencial invasivo. Sua ausência é utilizada como um indicador de boas práticas de higiene pós-ordenha na rotina (GONÇALVES, 2012).

O objetivo deste trabalho é quantificar a ocorrência de mastite bovina causada por *Corynebacterium sp.* do período de janeiro de 2012 a maio de 2017, a partir de amostras de leite provenientes da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul e analisadas pelo Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI, bem como apresentar seu perfil de sensibilidade frente a antibióticos de uso rotineiro em laboratório.

METODOLOGIA

Foram analisados os resultados de cultura bacteriana e antibiogramas realizados durante o período de janeiro de 2012 a maio de 2017 no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI. No total foram examinadas 702 amostras de leite mastítico, encaminhadas ao laboratório por médicos veterinários e produtores rurais da região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, para a realização da cultura microbiológica e também testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Ao chegar no laboratório, as amostras são protocoladas e encaminhadas para a realização dos cultivos em meios de cultura próprios para esta função. O cultivo e a identificação bacteriana foram realizados conforme Becton Dickinson (1984) e Mc Faddin (1980), seguido de análise do perfil de sensibilidade microbiana conforme a técnica de difusão em ágar descritas por Bauer, et al. (1966) com oito antibióticos habitualmente utilizados no laboratório.

As amostras foram identificadas individualmente e sucessivamente semeadas em meio específico, ágar McConkey e ágar sangue ovino 5% e dispostas para incubação em estufa bacteriológica à 36°C por um intervalo de tempo de 48 horas. Logo após este período, realizou-se a análise visual das colônias desenvolvidas nestes meios de cultura e a partir deste material efetivou-se a elaboração de esfregaço em lâminas e coloração de Gram, para a identificação morfo-tintorial inicial, dos microrganismos.

Posteriormente analisaram-se as lâminas em microscópio óptico, onde foi possível visualizar as características morfológicas do microrganismo encontrado, tornando possível a transferência destes para meios com substâncias específicas que evidenciam o metabolismo e a presença de

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

enzimas, viabilizando a identificação bacteriana presente na amostra do leite.

Em seguida ao processo de identificação, frações da amostra bacteriana, previamente isolada, foram dispostas em placas com ágar Mueller Hinton e espalhadas por toda sua superfície do ágar. A seguir, discos de antibiótico foram colocados de forma aleatória sobre o ágar semeado, e então, incubados à 36°C por 24 horas em estufa bacteriológica. Os antimicrobianos utilizados e comparados neste estudo foram: ampicilina (10 µg), cefalotina (30µg), eritromicina (15µg), enrofloxacin (5µg), gentamicina (10µg), penicilina (10 UI), sulfazotrim (25µg) e tetraciclina (30µg).

Posteriormente ao período de incubação, executou-se a medida, em milímetros, com régua milimetrada, dos halos de sensibilidade aos medicamentos, possibilitando classificá-los em sensível, quando o fármaco foi eficaz ao combate da bactéria, intermediário, quando demonstra ação parcial ao combate da bactéria e resistente, caso não promova a inibição do crescimento bacteriano.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Entre janeiro de 2012 e maio de 2017, foram analisadas 702 amostras de leite oriundas da região Noroeste do Rio Grande do Sul. A pesquisa demonstrou com base nestas amostras, que os agentes etiológicos mais recorrentes na região são *Staphylococcus aureus* (25%), *Streptococcus uberis* (11%), *Escherichia coli* (11%), *Corynebacterium sp.* (8%), *Streptococcus spp.* (6%), *Enterobacter spp.* (5%) e *Staphylococcus intermedius* (5%).

As corinebactérias são bacilos pleomórficos, Gram-positivos, não esporulados e imóveis. Habitualmente, quando coradas, se demonstram isoladas, em paliçadas de células paralelamente dispostas ou então agrupadas de forma a lembrar letras chinesas. Meios enriquecidos são os mais indicados para o seu crescimento e a maioria das corinebactérias são anaeróbicas facultativas, ou seja, na ausência de oxigênio recorrem a processos fermentativos como fonte de energia. Apresentam reação de oxidase negativa e catalase positiva (ZEE & HIRSH, 2009).

A infecção por este agente etiológico se confirmou em 8% das amostras, totalizando 54 casos, deixando o gênero em quarto lugar no perfil microbiológico geral das mastites na região estudada. Langoni *et al.* (2011) afirma em seu trabalho que com 29,52% a *Corynebacterium sp.* é a principal causadora desta doença no estado de São Paulo. O mesmo resultado foi encontrado por Brito *et al.* (1999) em regiões do estado de Minas Gerais, apresentando o gênero como causador em 55,2% dos casos.

Barbalho & Mota (2001) relataram que bactérias do gênero *Corynebacterium sp.* foram isoladas em 27,91% dos casos analisados no estado de Pernambuco. Na região agreste do mesmo estado, Sá *et al.* (2000) classifica o agente como a segunda maior causa de mastite, representando 13,29% das amostras analisadas. Martins *et al.* (2010) apresenta em seu trabalho que as corinebactérias representam 27,6% das causas de infecção dentro de um total de 65% das amostras de leite de quartos mamários afetados.

Além do cultivo microbiano, o antibiograma se torna essencial pois demonstra previamente a eficácia dos fármacos em relação a agentes específicos anteriormente cultivados, o que garante sucesso e segurança na escolha do fármaco para o tratamento (BUENO, 2003). Os resultados

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

encontrados para o perfil de sensibilidade da *Corynebacterium sp.* em relação aos antibióticos comumente utilizados no laboratório estão expressos na tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de sensibilidade da *Corynebacterium sp.* em relação aos antibióticos de uso rotineiro do Laboratório de Microbiologia Veterinária-UNIJUI.

AGENTE ETIOLÓGICO	ANTIMICROBIANO							
	AMP ¹	CFL ²	ENO ³	ERI ⁴	GEN ⁵	PEN ⁶	SUT ⁷	TET ⁸
<i>Corynebacterium sp.</i>	32%	49%	94%	30%	80%	25%	56%	69%

Ampicilina¹, Cefalotina², Enrofloxacin³, Eritromicina⁴, Gentamicina⁵, Penicilina⁶, Sulfazotrim⁷ e Tetraciclina⁸.

Conforme a tabela, as drogas de maior eficácia contra *Corynebacterium sp.* encontrados neste estudo foram enrofloxacin e gentamicina e as de maior resistência penicilina, ampicilina e eritromicina. Bueno (2003) alcançou resultados semelhantes em seu trabalho, alta resistência a ampicilina, penicilina e oxacilina; e elevada sensibilidade para gentamicina, neomicina, cefalexina, associação de cefalexina e neomicina e tiamulina. Resultados análogos aos observados por Oliveira *et al.* (2011), que constataram que dos antimicrobianos testados a tetraciclina, estreptomicina, neomicina, kanamicina, cefoxitina, cefalotina e gentamicina apresentaram sensibilidade de 100%; e resistência a ampicilina, penicilina, oxacilina e sulfazotrim, corroborando com o presente estudo.

O constante aumento do número de casos de mastite bovina causada por bactérias do gênero *Corynebacterium sp.* em diversas regiões do Brasil preconiza possíveis falhas de higiene dentro do sistema de produção, podendo estar associado a ausência de bons hábitos ou a ineficácia dos produtos utilizados, o que acaba comprometendo a produção e principalmente a qualidade do leite devido ao leve aumento na contagem de células somáticas que elas causam. O controle destas bactérias se faz imprescindível devido ao fato de estar associado ao quadro de animais portadores, mascarados por falsos negativos na avaliação com o método de California Mastitis Test (CMT) implantando na propriedade a possibilidade de disseminação entre os demais, aumentando o impacto econômico (BUENO, 2003).

CONCLUSÃO

Os resultados encontrados afirmam que o gênero *Corynebacterium sp.* é bastante frequente nos casos de mastite da região Noroeste do Rio Grande do Sul. Os antimicrobianos que apresentaram maior eficácia foram enrofloxacin e gentamicina.

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.
- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, p. 31-36, 2001.

01 a 04 de outubro de 2018

Evento: XXVI Seminário de Iniciação Científica

- BECTON DICKINSON and COMPANY. **Manual DIFCO**. Ed. Detroit, 1984.
- BUENO, V. F. F. Etiologia e suscetibilidade a antimicrobianos dos agentes da mastite bovina isolados na região de Pirassununga, SP, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 33-44, 2003.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. O. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 2, 1999.
- GONÇALVES, J. L. **Produção e composição do leite em vacas com mastite causada por *Corynebacterium* spp.** Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e produção Animal, Pirassununga, 2012.
- MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; FILHO, E. S. A. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina na microrregião de Cuiabá, MT, Brasil. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, 2010.
- OLIVEIRA, C. M. C.; SOUSA, M. G. S.; SILVA, N. S.; MENDONÇA, C. L.; SILVEIRA, J. A. S.; OIAGEN, R. P.; ANDRADE, S. J. T.; BARBOSA, J. D. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira Rondon do Pará, estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 2, Rio de Janeiro, fev, 2011.
- RIBEIRO, M. E. R.; PETRINI, L. A.; AITA, M.F., BALBINOTI, M.; STUMPF JR, W.; GOMES, J. F.; SCHRAMM, R. R.; MARTINS, P. R.; BARBOSA, R. S. Relação entre mastite clínica, subclínica infecciosa e não infecciosa em unidades de produção leiteiras na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, v.9, n.3, p.287-290, jul-set, 2003.
- SAAB, A. B.; ZAMPROGNA, T. O.; LUCAS, T. M.; MARTINI, K. C.; MELLHO, P. L.; SILVA, A. V.; MARTINS, L. A. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, PR. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v.35, n.2, p.835-844, mar/abr, 2014.
- SILVA, M. V. M.; NOGUEIRA, J. L.; PASSOS, C. C.; FERREIRA, A. O.; AMBRÓSIO, C. E. A mastite interferindo no padrão de qualidade do leite: uma preocupação necessária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.14, jan, 2010.
- SÁ, M. E. P.; MOTA, R. A.; SOUZA, M. I.; OLIVEIRA, A. A. F. Etiologia da mastite subclínica em bovinos leiteiros do agreste meridional do estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 100-103, 2000.
- ZEE, Y. C. e HIRSH, D. C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2009.
- LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J. C. C.; LAURINO, F.; MARTINS, P. Y. F.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA, A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, Rio de Janeiro, dez, 2011.
- Mc. FADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.