

# ISOLAMENTO E PERFIL DE SENSIBILIDADE DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE MASTITE SUB-CLÍNICA COMPARANDO-SE QUATRO PROPRIEDADES LEITEIRAS DE PEQUENO E MÉDIO PORTE NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA

BIONDO, N<sup>1</sup>. PRESOTTO, R<sup>1</sup>. LUBECK, F<sup>2\*</sup>. GENARI, V<sup>3</sup>.

1. Acadêmica de Medicina Veterinária da UNOESC. 2 Docente, Msc. Méd. Veterinária UNOESC. 3. Méd. Veterinário.

Endereço

Irina Lubeck

Rua Cesar Lombroso, 29/202

Porto Alegre – RS

CEP: 90430240

Resumo:

A mastite é a inflamação da glândula mamária e afeta a qualidade e quantidade do leite produzido, podendo ocorrer sob as formas clínica e sub-clínica. A mastite sub-clínica, não apresenta sinais visíveis do processo inflamatório, porém, apresenta resultado positivo no *California Mastitis Tests* (CMT). A etiologia é complexa e multivariada. Analisaram-se quatro propriedades leiteiras de Santa Catarina totalizando 77 animais que foram submetidos ao teste de CMT, e coletadas amostras de tetos positivos para processamento microbiológico no laboratório de Microbiologia da UNOESC – Campus de Xanxerê. Os microrganismos devidamente identificados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos. A ocorrência de mastite sub-clínica foi de 51,95%. Nas propriedades A e C a predominância dos isolados foi *Staphylococcus* sp enquanto que na propriedade C ainda foram encontradas leveduras. A propriedade B, apresenta histórico de alta ocorrência de mastite, sendo a maioria dos isolados os característicos de mastite ambiental e leveduras. A propriedade D apresentou isolados comuns a mastite ambiental e contagiosa. Os isolados totais de *Staphylococcus* sp. se apresentaram sensíveis ao ceftiofur, 96,9% e florfenicol, 81,3%; os isolados de *Streptococcus* sp. ao ceftiofur e sulfametoxazol+trimetoprim, 100%; e, os isolados de *E.coli* a enrofloxacina e gentamicina, 100%.

Embora o controle da mastite seja amplamente difundido e utilizado na produção leiteira ainda é imprescindível o controle contínuo da enfermidade através da realização do teste de CMT, tratamento dos bentes, adoção de práticas de manejo e maior cautela quanto à higienização. A alta prevalência de leveduras sugere uso de tratamento antifúngico além do antibiótico.

Palavras-chave: Leite, mastite, *Staphylococcus* sp., propriedade, levedura.

Abstract

Mastitis is an inflammation of the mammary gland and affects the quality and quantity of the produced milk and can occur under sub-clinical and clinical forms. The sub-clinical mastitis, doesn't show any visible signs of the

inflammatory process, but is positive under the California Mastitis Tests (CMT). Its etiology is complex and multivariate. Here we analyzed four milk properties of Santa Catarina totalizing 77 animals that were submitted to the CMT test, and had milk collected from positive samples for microbiological processing at the UNOESC - Campus of Xanxerê laboratory of Microbiology. The microorganisms identified were also submitted to antimicrobial sensibility test. The occurrence of sub-clinical mastitis was 51.95%. In properties A and C the predominant microorganism isolated was *Staphylococcus* sp. And in property C yeasts were also found. The property B, has history of high occurrence of mastitis, and the majority of the microorganisms found were from environmental source and yeast. In the property D microorganisms from environmental and contagious mastitis were isolated. *Staphylococcus* sp. Isolates were sensitive to ceftiofur, 96.9%, and florfenicol 81.3%; *Streptococcus* sp. to ceftiofur and trimethoprim+sulfametoxazol, 100%, and *E.coli* to enrofloxacin and gentamicin, 100%. Although the mastitis control is greatly diffused and done in milk production, It is essential its greater and continuous control through the CMT test, treatment of patients as well as the adoption of management practices and greater caution about the hygienisation. The high prevalence of yeast suggests use of antifungal treatment than the antibiotic.

Key-words: Milk, mastitis, *Staphylococcus* sp., property, yeast

Introdução:

O sistema agro-industrial do leite é um dos mais importantes do país, o leite é considerado o mais nobre dos alimentos, por sua composição rica em proteína, gordura, carboidratos, sais minerais e vitaminas, proporcionando ainda elementos anticarcinogênicos, vitaminas A e D e é fonte nutricional e imunológica para o neonato. (MÜLLER, 2002)

De acordo com Dias (2007), sua qualidade está diretamente relacionada com saúde, alimentação e manejo dos animais, com a qualidade da mão-de-obra, manejo dos equipamentos e utensílios utilizados durante a ordenha e transporte até a indústria.

A qualidade do leite *in natura* pode ser influenciada por muitos fatores, onde se destacam os fatores zootécnicos como manejo, alimentação, genética dos rebanhos e em relação à obtenção e armazenagem do leite. Uma das causas que desempenham influência negativa sobre a qualidade e quantidade do leite é a mastite, resultando no aumento na contagem de células somáticas (CCS), como células de defesa, bacterianas e descamação. (MULLER, 2002). Ribeiro e colaboradores (2003), consideram a mastite bovina a doença que acarreta os maiores prejuízos econômicos à produção leiteira, pela redução da qualidade e da quantidade do produto.

Segundo Ribeiro, *et al.* (2003) a mastite é uma doença que normalmente ocorre em resposta à infecção intra-mamária. Ela pode ocorrer sob duas formas: a clínica e a sub-clínica. A mastite sub-clínica é a de maior ocorrência caracterizando-se por não apresentar sinais físicos evidentes no úbere do processo inflamatório agudo, sendo crônicas, e apesar do aspecto inofensivo, causam prejuízos econômicos e servem de fonte de infecção, não alterando visivelmente o leite, mas sim alterando sua composição. A mastite infecciosa sub-clínica é aquela que apresenta resultado positivo ao teste de *California*

*Mastitis Tests* (CMT) que é o mais usual para o diagnóstico sendo um indicador da CCS no leite, ou outros testes e pode ser confirmada pelo crescimento microbiano.

Dias, (2007) afirma que em casos de mastite clínica ocorrem sinais de inflamação, como edema, hipertermia, endurecimento e dor na glândula mamária, e/ou aparecimento de grumos e pus.

O exame microbiológico é o método padrão para determinação da saúde do úbere e para o diagnóstico da mastite, fornecendo dados seguros ao veterinário, para tomar medidas específicas de controle.

A etiologia da mastite é complexa e multivariada vários são os agentes etiológicos causadores da mastite bovina, porém, a predominância é de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* (RIBEIRO, *et al.* 2003). Microrganismos mesófilos predominam devido à falta de higiene e à falta de refrigeração do leite onde cita-se *Streptococcus sp* e enterobactérias. Os microrganismos psicrófilos predominam da água, solo e cama dos animais, sendo que dentre estes destacam-se, *Yersinia spp*, *Listeria spp* e *Bacillus spp* os quais são capazes de provocar doenças em seres humanos pela ingestão do leite cru, em condições especiais. (FONSECA, *et al.* 2000).

Depois de secretado do úbere, o leite pode ser ainda contaminado por microrganismos a partir da glândula mamária, da superfície exterior do úbere e tetos, e da superfície do equipamento e utensílios de ordenha e tanque.(GUERREIRO, *et al* 2005).

## Material e métodos

O presente trabalho foi realizado em quatro propriedades de bovinos leiteiros na região oeste de Santa Catarina, sendo três dessas de médio porte e uma de pequeno porte no período de Fevereiro à Junho de 2008. Foram avaliados no total 77 animais sendo todos fêmeas em estágio de lactação. Os animais foram submetidos ao teste de CMT, e coletadas amostras dos tetos positivos. Posteriormente, foram colhidas informações sobre o animal onde cita-se: produção média diária, ordem de parto, padrão racial, e ocorrência anterior de mastite. No que diz respeito às propriedades, foram colhidas informações sobre: manejo e tipo de ordenha, manejo e terapia vaca seca, histórico de mastite e aspecto geral do ambiente em que os animais permaneciam.

O teste de CMT foi realizado da seguinte forma: higienização dos tetos conforme rotina da propriedade, sendo que antes da realização do teste, os tetos foram mergulhados em Álcool 70% para desinfecção. Foram desprezados os primeiros jatos para limpeza do canal do teto e eliminação de sujidades ou até microrganismos. Foi coletado leite dos quartos mamários individualmente em uma bandeja especial denominada “raquete” era adicionado o detergente aniônico neutro. Esse detergente age rompendo as células e expondo o material nucléico (DNA) de alta viscosidade. Essa reação pode ser em diversas intensidades variando de negativa, reação leve (+), reação moderada(++) à reação intensa(+++)(FONSECA, *et al*, 2000). Amostras de quartos mamários que reagiram os teste de CMT foram coletadas, aproximadamente 5ml em frascos estéreis e armazenadas em caixas isotérmicas a 4°C até o transporte ao laboratório, devidamente identificadas para análise microbiológica (bactérias e fungos). No laboratório de Microbiologia Veterinária da UNOESC – Campus de Xanxerê essas amostras foram semeadas em meio de Agar Sangue ovino

5% (AS), meio de Agar MacConkey (MC) e Agar Dextrose Sabouraud (Asab). Após semeadura nos meios específicos, as placas foram incubadas em estufa de bacteriologia à 37°C por 24hs, após este período as colônias que haviam crescido eram isoladas e identificadas. As placas eram ainda mantidas por mais 24 h para avaliação de crescimento bacteriano e 72 h para verificação de crescimento fúngico. A identificação microbiológica foi realizada com base nas características morfológicas, bioquímicas e tintoriais de acordo com QUINN et al (1994).

Os microrganismos devidamente identificados foram submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma), com a finalidade de verificar a resistência das bactérias aos antibióticos correntemente utilizados para tratamento sistêmico ou intramamário de mastites. As colônias foram repicadas para o meio de Muller Hinton (MH) caldo e incubadas por 12hs à 37°C ou até atingir turvação correspondente a escala 0,5 de MacFarland e posteriormente repicadas uniformemente ao meio de Agar MH com auxílio de um *swab* e aplicados os discos dos antibióticos: gentamicina, neomicina, sulfametoxazol + trimetoprim, trimetoprim, florfenicol, ceftiofur, enrofloxacina, apramicina, doxiciclina, josamicina, amoxicilina e ampicilina. Seguindo a técnica de difusão em disco descrita por Bauer *et al.* (1966).

Os resultados do meio de Asab foram classificados somente como positivos ou negativos para crescimento fúngico.

## Resultados e discussão

A análise global dos dados nos mostra uma ocorrência de 51,95% de mastite sub-clínica nas propriedades estudadas quando da realização do teste de CMT. Na propriedade A, de médio porte, houve a predominância de isolados naturalmente responsáveis por mastite contagiosa (FONSECA, *et al.* 2000). Embora nesta propriedade tenham sido observadas as menores taxas de crescimento microbiano, *Staphylococcus* sp. correspondeu a 50% dos isolados. A propriedade B, de médio porte, que apresenta histórico de alta ocorrência de mastite, principalmente com aumento da prevalência nas épocas de chuva e frio apresentou isolados comumente relacionados a mastite ambiental. Isto pode ser explicado pelo ambiente úmido da propriedade, onde, existe grande quantidade de campo úmido e sem vegetação. Os isolados de *Escherichia coli* e *Proteus vulgaris* corresponderam a 8% dos isolados e leveduras foram encontradas em 16% das amostras desta propriedade. A propriedade C foi a que apresentou maior número de animais positivos no teste de CMT correspondendo a 76,5%. Dentre os isolados do referido estabelecimento predominaram *Staphylococcus* sp. em 32,3% e leveduras em 8,8%. No entanto, essa propriedade apresentou grande número de amostras sem crescimento bacteriano, sendo essas correspondentes a 53% o que pode ser explicado pela existência de algum agente agressor como, por exemplo, produtos químicos ou ainda processos de auto-cura. A propriedade D de pequeno porte, apresentou isolados comuns tanto a mastite ambiental como contagiosa onde preponderou *Staphylococcus* sp. em 37,1% das amostras, seguido de *Streptococcus* sp. em 11,1% e *E. coli* em 7,4% e leveduras também em 7,4%. Essa propriedade usa manejo rápido para secar a vaca diferindo das demais, o que em nossos resultados parece não haver correlação com a

ocorrência da mastite. A ordem de parto também não influenciou a ocorrência de mastite onde 45% das vacas afetadas já haviam gerado mais de um produto encontrando-se até o terceiro parto; e, 55% das vacas com histórico de quatro ou mais. O padrão racial dos animais também não mostrou afetar a ocorrência de mastite sub-clínica. Todas as propriedades apresentavam ordenha mecânica, diferindo entre elas o manejo de ordenha. Na propriedade A o manejo baseava-se na higiene dos tetos sujos, uso de desinfetante antes da ordenha (*pré-dipping*), ordenha e uso de desinfetante pós-ordenha (*pós-dipping*), seguindo o que indica FONSECA et al (2000). Na propriedade B era rotina a lavagem de todos os tetos, *pré-dipping*, desprezo dos primeiros jatos, ordenha e *pós-dipping*. Nas propriedades C e D os tetos eram lavados com água corrente e após a ordenha fazia-se o uso do *pós-dipping*. Embora existam diferenças no manejo entre as propriedades, essas não influenciaram nos resultados finais.

A sensibilidade em relação a todos os isolados foi: *Staphylococcus* sp. sensível ao ceftiofur, 96,9%; florfenicol, 81,3%; josamicina, 84,4%; Sulfa+trimetoprim, 78,1% e gentamicina, 68,8%. Os isolados de *Streptococcus* sp. se apresentaram 100% sensíveis a ceftiofur, josamicina e sulfa+trimetoprim. E *E.coli* mostrou sensibilidade à enrofloxacin e gentamicina em todas as amostras e ao florfenicol em 75% delas. Para *P. vulgaris* a gentamicina foi o antibiótico que se mostrou capaz de controlar microrganismo *in vitro* em contrapartida josamicina e ampicilina não se mostraram capazes. A sensibilidade dos isolados variou muito entre as opções antimicrobianas, porém existem ainda diversas opções de tratamento, mas para uma escolha consciente indica-se o antibiograma individual de cada animal.

Os gêneros de microrganismos não identificados nos fazem suspeitar de bactérias ambientais já que estes foram isolados da propriedade B onde há grande ocorrência de mastites e o ambiente é propício pela grande quantidade de barro e áreas úmidas.

## Conclusões

- Os manejos das propriedades indiferem na quantidade e frequência de isolados e ocorrência de mastite;
- A adoção de medidas de controle e maiores condições de higiene se fazem necessárias bem como atenção maior quanto as opções terapêuticas pelo grande número de isolados fúngicos;
- As propriedades com ambiente inadequado onde existe maior umidade apresentaram isolados compatíveis com os de mastite ambiental citados pela literatura, pelos resultados fica evidente uma grande relação entre ambiente e microrganismo;
- As opções terapêuticas, antibióticos, são muitas, e todas com índices bons de sensibilidade o que garante na falta da possibilidade de realização do antibiograma opções de tratamento, porém cada caso é um caso e todo animal deve ser avaliado separadamente quanto a isso.

## Referências bibliográficas

DIAS, Regina Valéria da Cunha. Principal methods for diagnostics and control of dairy mastitis. **Acta Veterinária Brasílica**, v. 1, p. 23-27, 2007.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.

GUERREIRO, P.K.; MACHADO, M.R.F.; BRAGA, G.C.; GASPARINO, E; FRANZENER, A.S.M. Microbiological quality of milk through preventive techniques in the handling of production. **Ciências Agrotécnicas**. Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, jan./fev. 2005

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B. et al. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648p.

RIBEIRO, Maria E. R.; PETRINI, Lelis A. ; AITA, Marta F.; BALBINOTTI, Maira; STUMPF JR, Waldyr; GOMES, Jorge F.; SCHRAMM, Renata C.; MARTINS, Paulo R.; BARBOSA, Rosângela S. Relation between clinical, subclinical infectious and non infectious mastitis in milk production units in the southern region of the Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira Agrocência**, v. 9, n. 3, p.287-290, jul-set, 2003.

MÜLLER, E.E. Qualidade de leite, células somáticas e prevenção da mastite. **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre sustentabilidade da pecuária leiteira na região sul do Brasil**. p. 206-217, ago, 2002.

BAUER, A.W.; KIRB, W.M.M.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, p.493-496, 1966.