

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

Tassiéli Senger Kaiser², Luciane Ribeiro Viana Martins³, Denize Da Rosa Fraga⁴, João Carlos Ganacini⁵, Luciana Mori Viero⁶.

¹ Projeto de Pesquisa Institucional, desenvolvido no Departamento de Estudos Agrários, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Saúde Animal

² Bolsista PROBIC/FAPERGS, tassieli.kaiser@hotmail.com

³ Coordenadora e orientadora do Projeto de Pesquisa, luciane.viana@unijui.edu.br;

⁴ Colaboradora do Projeto de Pesquisa, denise.fraga@unijui.edu.br;

⁵ Graduando em Medicina Veterinária, UNIJUI, joaganacini@hotmail.com;

⁶ Coordenadora do Projeto de Pesquisa, luciana.viero@unijui.edu.br.

Introdução

A mastite é um dos principais problemas da pecuária leiteira, pois provoca redução na capacidade de produção de leite, alteração da composição do leite, aumento na contagem das células somáticas, descarte prematuro dos animais acometidos e prejuízos econômicos aos produtores rurais e à indústria de laticínios (OKURA, RIGOBELLO, ÁVILA, 2005). É importante traçar o perfil microbiológico regional, através da cultura, isolamento e identificação dos microrganismos infectantes do leite, para que se possa posteriormente, estimar os riscos à saúde pública, determinar manejos específicos e auxiliar na conduta terapêutica do rebanho bovino leiteiro através da realização do antibiograma (RIBEIRO, et al., 2003). Os objetivos deste trabalho foram identificar os gêneros e as espécies bacterianas causadores da mastite bovina na região Noroeste do Rio Grande do Sul, identificar os microrganismos presentes no leite que oferecem risco à saúde pública, determinar o perfil de sensibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos e relacionar os patógenos encontrados com o manejo empregado na atividade leiteira.

Metodologia

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UNIJUI (LAMIVET) a partir do recebimento de amostras de leite da região. As amostras foram semeadas em meios específicos para o cultivo bacteriano e mantidas na estufa sob temperatura controlada de 36°C durante vinte e quatro horas. Após esse período, havendo crescimento do microrganismo, confeccionou-se esfregaço em lâmina corando-o em Gram (GRAM, 1884). A lâmina foi então observada em microscópio ótico para identificação da forma e coloração do microrganismo para posterior identificação do gênero e espécie do mesmo através de testes bioquímicos.

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

As análises laboratoriais seguiram os critérios de identificação fenotípica descritos por Becton Dickinson (1984) e Mc Fadidin (1980). Após a identificação da espécie, foi realizado o antibiograma para verificação da sensibilidade do agente patogênico frente aos 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.

Todos os materiais envolvidos na análise laboratorial (placas de Petry, tubos de ensaio, meios de cultura, etc.) são esterilizados ou autoclavados para que os microrganismos existentes no meio ambiente não contaminem e não interfiram no resultado do processamento das amostras.

Resultados e discussão

Foram analisadas 295 amostras de leite provenientes dos municípios: Ajuricaba, Augusto Pestana, Boa Vista do Cadeado, Bossoroca, Catuípe, Chiapeta, Condor, Coronel Barros, Eugênio de Castro, Jóia, Ijuí, Pejuçara, Panambi, Chiapeta, Bozano, Entre-Ijuís, Santo Augusto, Três de Maio e Vitória das Missões, obtendo-se 323 cultivos distintos, sendo que em 255 cultivos obtiveram-se culturas microbiológicas e em 68 cultivos, ausência de microrganismos. Destes resultados, 24,61% corresponderam a *Staphylococcus aureus*; 16,80% para *Streptococcus uberis*; 8,98% para *Corynebacterium* sp.; 8,20% Enterobactéria não coliforme; 5,86% para *Staphylococcus coagulase* positiva e *Staphylococcus intermedius*; 5,08% para *Escherichia coli*; 3,52% para *Staphylococcus epidermidis*; 3,13% para *Staphylococcus coagulase* negativa; 2,73% para *Corynebacterium bovis*; 2,34% para *Staphylococcus haemolyticus* e leveduras; 1,95% *Streptococcus dysgalactiae*; 1,56% para *Staphylococcus hyicus*; 1,17% para *Corynebacterium pseudotuberculosis*; 0,78% para *Bacillus Cereus*, *Bacillus* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp.; 0,39% para *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus* sp., *Prototheca*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus agalactiae*.

Os agentes etiológicos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Staphylococcus coagulase* negativa e *Staphylococcus intermedius* são os principais causadores da mastite contagiosa (RADOSTITS et al., 2010). Os microrganismos contagiosos estão adaptados a sobreviver no organismo do hospedeiro (BRADLEY, 2002). Eles são transmitidos principalmente durante a ordenha através das mãos dos ordenhadores; do equipamento da ordenha contaminado com leite de animais infectados; da amamentação dos bezerros, os quais podem transmitir as bactérias de um quarto mamário a outro; e da utilização de panos e esponjas (COSTA et al., 2001), esses fatores contribuem para disseminação da mastite no rebanho.

Além dos microrganismos já mencionados, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, leveduras, *Klebsiella pneumoniae*,

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

Enterobacter aerogenes, enterobactéria não coliforme, *Enterococcus* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* são os principais agentes causadores da mastite ambiental (GRUET et al., 2001), e atuam como invasores oportunistas da glândula mamária e não são adaptados a sobreviver no organismo do hospedeiro ficando preferencialmente no habitat da vaca em locais que apresentam acúmulo de fezes, urina, barro e camas orgânicas.

O manejo correto da ordenha inclui um conjunto de ações como higienização das mãos do ordenhador, desinfecção dos tetos antes da ordenha, estimulação da ejeção e extração rápida do leite, desinfecção dos tetos após a ordenha e a limpeza e sanitização do equipamento de ordenha após todas as ordenhas (BRESSAN, MARTINS, VILELA, 2000). Santos e Fonseca (2006) complementam ainda que quando empregados de forma apropriada, essas ações constituem-se na estratégia mais eficiente na prevenção da transmissão dos agentes contagiosos e ambientais durante a ordenha.

O leite é rico em nutrientes fundamentais à dieta humana, mas também se constitui num meio de cultura para microrganismos (SILVA et al., 2008). A qualidade do leite é uma preocupação constante principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos relacionados com surtos de doenças de origem alimentar (TIMM et al., 2003). Os patógenos, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Streptococcus* spp, *Corynebacterium* spp., representam um risco iminente aos consumidores de produtos lácteos, pois produzem enterotoxinas ou enzimas lipolíticas e proteolíticas que auxiliam na manutenção da atividade celular bacteriana resistindo aos tratamentos térmicos aplicados ao leite (MARTINS, MARQUES, NETO, 2006; NÖRNBERG, TONDO, BRANDELLI, 2009).

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 UNIJUI. Dessa forma, foram mais significativas as amostras contendo *Staphylococcus aureus* (24,61%), *Staphylococcus intermedius* (5,86%), *Streptococcus uberis* (16,80%), *Staphylococcus coagulase positiva* (5,86%) e *Corynebacterium* sp (8,98%). Os antibióticos mais eficazes para o *Staphylococcus aureus* e o *Staphylococcus intermedius* foram tetraciclina e cefalotina e os antibióticos menos eficazes foram ampicilina, penicilina e eritromicina. Os autores Andrade et al. (2000), Costa et al. (2000), Byaru-gaba (2004) e Zanette, Scapin, Rossi (2010) encontraram resistência *in vitro* de *Staphylococcus aureus* à ampicilina e penicilina. Neste trabalho observou-se que o *Staphylococcus coagulase* + apresentou sensibilidade a cefalotina, tetraciclina e penicilina em diferentes graus e maior resistência a eritromicina.

Nenhum dos antibióticos testados para *S. uberis* mostrou-se totalmente eficaz demonstrando que os antibióticos têm sido utilizados de forma indiscriminada, alternando-se princípios ativos e

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica

contribuindo para a resistência da bactéria, esses resultados diferiram dos encontrados por Starling et al (2011).

O antimicrobiano tetraciclina apresentou alta porcentagem sensibilidade no teste in vitro para a espécie *Corynebacterium* sp. No trabalho desenvolvido por Oliveira et al. (2011), os resultados encontrados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Na prática, os antimicrobianos utilizados de forma errônea e abusiva, sem prévia cultura e antibiograma, em animais de produção, contribuem para gerar cepas resistentes de microrganismos que podem ser transmitidas ao ser humano pela ingestão de produtos de origem animal (WHITE e MCDERMOTT, 2001; ZANETTE, SCAPIN, ROSSI, 2010). Destaca-se também que a presença de resíduos de antibióticos no leite pode provocar reações de hipersensibilidade e possível choque anafilático em consumidores de produtos lácteos sensíveis aos antimicrobianos caracterizando outro relevante risco à saúde pública (MARTINS, MARQUES, NETO, 2006). Neste contexto, enfatiza-se a importância da identificação dos microrganismos presentes no leite bovino para realização de antibiograma, determinando assim sua sensibilidade frente aos antimicrobianos para que estes sejam utilizados de forma correta.

Conclusões

A partir das amostras analisadas identificaram-se gêneros bacterianos bem adaptados à região Noroeste do RS, compostos por bactérias causadoras de mastite contagiosa e mastite ambiental. Tais resultados evidenciam que a realização dos procedimentos de ordenha e a antibioticoterapia nos animais clinicamente afetados não está sendo realizada de forma satisfatória, favorecendo os patógenos e levando-os à aquisição de resistência antimicrobiana.

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

Agradecimentos

Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e ao grupo de Pesquisa em Saúde Animal, pela contribuição e colaboração na execução do projeto.

Referências bibliográficas

- ANDRADE, M. A., et al. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. *Ciência Animal Brasileira* 1 (1): 53-57, jan/jun., 2000.
- 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. 10th.

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

- BRADLEY, A. J. Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, v. 164, n. 2, p. 116-128, 2002.
- BRESSAN, M.; MARTINS, C. E.; VILELA, D. Sustentabilidade da pecuária de leite no Brasil. 2000. Goiânia, 2 Simpósio, Anais. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, Goiânia: CNPq/Serrana Nutrição Animal, 2000. 206p.
- BYARUGABA, D. K. A view on antimicrobial resistance in developing countries and responsible risk factors. *International Journal Antimicrobial Agents*, Uganda, v. 24, p. 105-110, 2004.
- CAMPOS, O. F.; LIZIEIRE, R. S. O produtor pergunta, a Embrapa responde. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL; Brasília: Embrapa-SPI, 1993. 214p.
- COSTA, E. O., et al. Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* spp. Isolated from Mammary Parenchymas of Slaughtered Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medicine*, Berlin, v. 47, p. 99-103, 2000.
- GRAM, C. *Fortschr d. Med.*, 2, 185, 1884.
- 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.
- MARTINS, R. P.; MARQUES, M. R. H.; NETO, A. C. Etiologia da mastite subclínica em vacas do rebanho de uma queijaria em Nossa Senhora do Livramento, MT. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n. 13, p. 104-110, 2006.
- Mc. FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Ed. William & Wilkins Co., Baltimore, 1980.
- NÖRNBERG, M. F. B. L.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Bactérias psicrotróficas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta Scientiae Veterinariae*. Porto Alegre. 37(2): 157-163, 2009.
- OLIVEIRA C. M. C.; et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na bacia leiteira de Rondon do Pará, estado do Pará. *Pesq. Vet. Bras.* vol.31 no.2 Rio de Janeiro Feb. 2011.
- 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.
- RADOSTITS, O. M. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- REIS, G. L. et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.4, p.1134-1138, jul-ago, 2007.
- RIBEIRO, M. E. R., et al. 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. 287-294, 2003.
- SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. Barueri: Manole, 2006. 314p.

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

SILVA, M. C. D.; et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 28(1): 226-230, jan-mar, 2008.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 5. ed.

STARLING, R. Z. C. et al. Perfil da sensibilidade antimicrobiana e isolamento dos microrganismos causadores de mastite do gado bovino leiteiro no município de Alegre/ES. 38^a Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Conbravet). Florianópolis (SC): 2011. Disponível em <http://www.sovergs.com.br/site/38conbravet/resumos/28.pdf>. Acesso em 30/06/2014.

TIMM, C. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

WHITE, D. G.; MCDERMOTT, P. F. Emergence and transfer of antibacterial resistance. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 151-155, 2001. E. Suppl.

ZANETTE, E.; SCAPIN, D.; ROSSI, E. M. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de bovinos com suspeita de mastite. *Unoesc e Ciência – ACBS*, Joaçaba, v. 1, n. 1, p. 65-70, jan./jun. 2010.

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

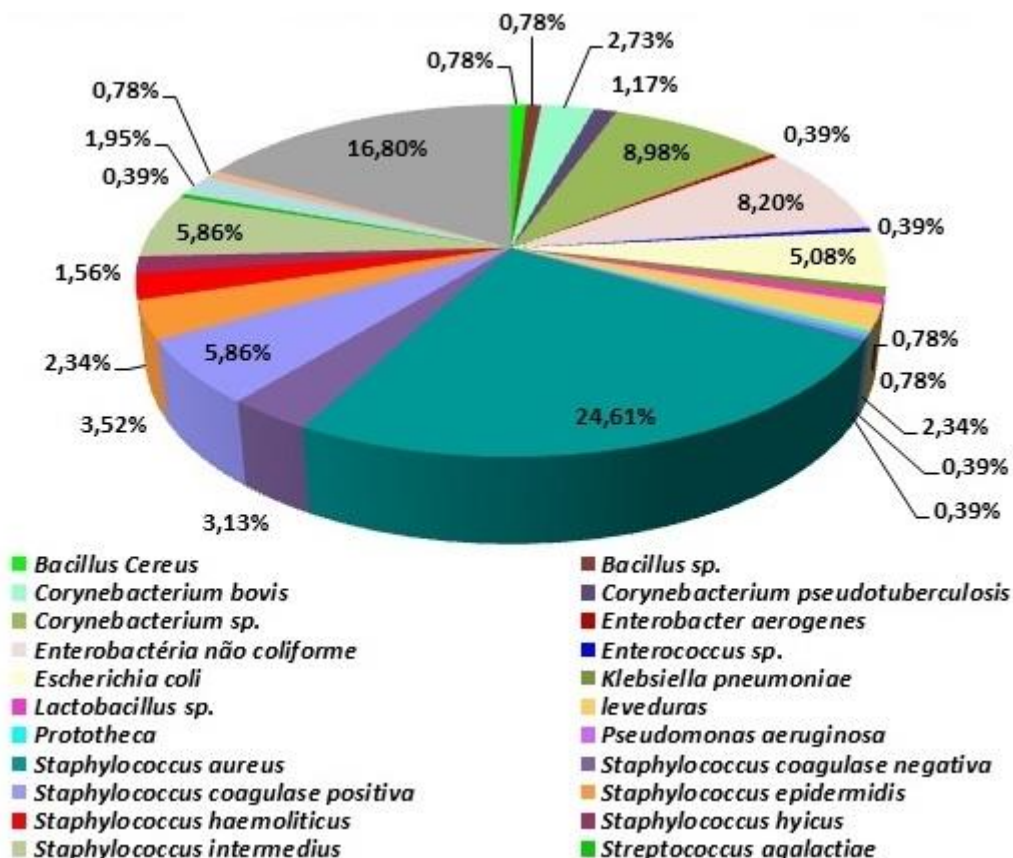


Gráfico 1. Percentual dos microrganismos encontrados na análise de leite da região Noroeste do RS. LAMIVET, UNIJUI, 2012-2014.

| MICROORGANISMOS | ANTIBIÓTICOS | | | | |
|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | AMP ¹ | CFL ² | ERI ³ | PEN ⁴ | TET ⁵ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 65% | 88% | 32% | 50% | 89% |
| <i>Staphylococcus intermedius</i> | 60% | 87% | 27% | 38% | 87% |
| <i>Streptococcus uberis</i> | 56% | 69% | 59% | 58% | 61% |
| <i>Staphylococcus coagulase +</i> | 67% | 100% | 50% | 83% | 100% |
| <i>Corynebacterium sp.</i> | 52% | 59% | 27% | 39% | 78% |

Ampicilina¹, cefalotina², eritromicina³, penicilina⁴ e tetraciclina⁵

Tabela 1. Porcentagem de sensibilidade dos microrganismos com maior ocorrência nas amostras de leite frente aos antimicrobianos. LAMIVET, UNIJUI, 2012-2014.

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