

ESTUDO DA ETIOLOGIA E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DAS PRINCIPAIS BACTÉRIAS ISOLADAS DE MASTITE BOVINA DE PROPRIEDADES RURAIS DE GOIÁS E DISTRITO FEDERAL– RESULTADOS PRELIMINARES

Juliana Dias MARTINS^{1*}, Edmar Soares NICOLAU², Eurione Antônio Garcia da Veiga JARDIM², Antônio Nonato de OLIVEIRA², Albenones José de MESQUITA², Michelly Freitas de MORAES³, Renata Oliveira FERRO⁴, Nayana Ribeiro SOARES³

¹Mestranda, UFG, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Goiânia, GO. ²Doutor, UFG, Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiânia, GO. ³Graduanda de Engenharia de Alimentos, UFG, Goiânia, GO. ⁴Graduanda de Medicina Veterinária, UFG, Goiânia, GO. *Endereço para correspondência: julianadias.vet@gmail.com

Palavras-chave: mastite bovina, leite, sensibilidade antimicrobiana, PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

As infecções da glândula mamária apresentam-se sob duas formas, a clínica e a subclínica. A forma subclínica mostra-se a mais prevalente, responsável por aproximadamente 70% das perdas econômicas, levando até mesmo a uma redução da secreção de leite em até 45% (HARMON, 1994).

A mastite clínica constitui-se num processo inflamatório da glândula mamária com evolução aguda a crônica e alterações de permeabilidade da membrana dos ácinos, o que ocasiona mudança na composição do leite (MÜLLER, 2002). As mastites causam aumento da contagem de células somáticas durante meses ou até o final da lactação (TAPONEN et al., 2007).

A mastite bovina pode ser classificada como contagiosa ou ambiental de acordo com o tipo de microrganismo causador das infecções nos rebanhos (ESSLEMONT & KOSSAIBATI, 2002), os agentes das mastites ambientais são *Escherichia coli*, coliformes, *Streptococcus uberis*, *Enterococcus* spp, *Streptococcus equinus* (anteriormente *S. bovis*) e outros *Streptococcus* do ambiente, e os contagiosos *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycoplasma*, *Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus* coagulase-negativos (BRITO, 2010).

As identificações dos agentes infecciosos em amostras de leite podem ser feitas através de diagnósticos microbiológicos, o qual é um método auxiliar no monitoramento das mastites, pois preservam a viabilidade dos microrganismos presente na amostra. Métodos de microbiologia convencional que fazem o isolamento do agente microbiano e a identificação bioquímica levam em média dois a três dias, até mesmo semanas para obter resultado. Portanto vários métodos têm

sido desenvolvidos para que acelerem os processos, como é o caso dos métodos moleculares que são mais rápidos, específicos, sensíveis e precisos (YANG et al., 2001; VERSALOVIC et al., 2002).

Nos últimos anos, diversos trabalhos reportaram o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR; *polymerase chain reaction*), para a detecção de patógenos em alimentos (GANDRA, 2006).

A técnica de PCR em tempo real identifica microrganismos e quantifica ácidos nucleicos. A reação é automatizada, a qual pode ser visualizada em alta resolução. Tem como vantagem a quantificação dos produtos amplificados que podem ser feitas de forma automática analisando a curva de amplificação do fragmento (LUND-OLESEN et al., 2008).

Pelo uso indiscriminado de antibióticos, cepas multi-resistentes já são isoladas das matrizes bovinas, dificultando o controle da doença (MACHADO et al., 2008). Diante do exposto, buscou-se a identificação dos microrganismos causadores da mastite, por meio de ensaios automatizados, bem como a determinação da sensibilidade “*in vitro*” a antimicrobianos, de maneira rápida e confiável.

METODOLOGIA

Foram analisadas 280 amostras de leite cru de matrizes provenientes de propriedades localizadas no Estado de Goiás e Distrito Federal, de vacas com mastite clínica, durante o período de maio de 2010 a fevereiro de 2011. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia (LMB), também foram analisadas 388 amostras de leite cru de vacas com mastite subclínica, durante o período de junho de 2010 a janeiro de 2011, no Laboratório de Biologia Molecular (LBM) do Centro de Pesquisa em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Inicialmente, para as amostras de leite de animais com mastite clínica, estas foram incubadas a 37 ± 1 °C/24h, plaqueadas em ágar sangue desfibrinado de ovino a 5% e incubadas a 37 ± 1 °C/24h. Após o isolamento e purificação das colônias em ágar nutriente, procedeu-se à análise de identificação e teste de suscetibilidade a antimicrobianos em conformidade com o protocolo especificado pelo fabricante do sistema VITEK (bioMérieux Laboratory). Adotou-se a análise estatística descritiva para análise dos dados.

Já para as amostras de leite de vacas que apresentaram mastite subclínica foram analisadas 20% das amostras que apresentaram contagem celular somática acima de 200.000 CS/mL as quais foram submetidas à técnica de PCR em tempo real utilizando o kit *Pathoproof™ Mastitis PCR Assay* (FINNZYMES DIAGNOSTICS®), que tem a capacidade de detectar, identificar e quantificar 11 microrganismos e 1 gene de resistência a β -lactamase.

Após a conclusão do estudo, os dados serão organizados e apresentados em tabelas e gráficos. Será realizado uma análise amostral para otimizar a obtenção e colheita de dados, os quais serão analisados através de uma estatística descritiva para verificação da frequência das variáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias Gram positivas de maior incidência isoladas nas amostras de leite de vacas com mastite clínica analisadas foram o *Staphylococcus aureus* (19,64%), *Staphylococcus spp* (10,71%) e *Streptococcus uberis* (8,93%). Foram testados 14 princípios ativos de antimicrobianos para bactérias Gram positivo, sendo que, para este grupo de microrganismos, o linezolid foi o antibiótico que apresentou a melhor atividade biológica antibacteriana, sendo evidenciado 98,1% de sensibilidade. Enquanto, a oxaciclina foi a que apresentou menor percentual de sensibilidade, demonstrando, nos testes *in vitro*, susceptibilidade para apenas 33,3% do total de microrganismos isolados.

Neste estudo as bactérias Gram negativas com maior incidência nas amostras de leite de vacas com mastite clínica analisadas foram *Escherichia coli* (44,74%) e *Klebsiella pneumoniae* (18,42%). Para este grupo de microrganismos, foram utilizados 16 princípios ativos de antimicrobianos, dos quais a amikacina, ciprofloxacina, imipeneme e levofloxacina apresentaram sensibilidade de 97,4%, ao passo que, a ampicilina, com 78,9%, foi a que apresentou o menor percentual de sensibilidade. Estes resultados estão em conformidade com o exposto por Erskine et al. (2002) quando afirmaram que as bactérias Gram-negativas, em geral, são suscetíveis à gentamicina, amicacina, polimixinas, e às cefalosporinas de 2ª e 3ª geração, tais como a cefuroxina e cefoperazona e que a maioria é resistente à estreptomicina, neomicina, tetraciclina, ampicilina e amoxicilina. Como também, estão em concordância com os relatos de Andrade et al. (2000) que justificaram a

menor taxa de eficácia dos antibióticos ampicilina, cefazolina, oxacilina e penicilina-G em razão do uso indiscriminado e inadequado (subdosagens) destes antimicrobianos na prática veterinária, pois que são estes os antibióticos mais frequentemente utilizados para controle de mastite.

Neste estudo, foi verificada eficácia de 100% sobre as cepas de *S. aureus* nos testes realizados com os princípios ativos gentamicina, ciprofloxacina, linezolid e vancomicina. Estes resultados assemelham-se aos apresentados por Zanette et al. (2010) que analisaram 55 amostras de leite de vacas de propriedades rurais da região do extremo oeste de Santa Catarina, das quais, 39 amostras (70,9%) apresentaram crescimento de *S. aureus* e os antibióticos mais eficazes foram o sulfazotrin e ciprofloxacina com 97,44% e vancomicina com 94,87%, enquanto a menor eficácia foi obtida com a penicilina (46,15%), a tetraciclina (30,77%) e a clindamicina (20,51%).

As bactérias Gram positivas de maior incidência isoladas nas amostras de leite de vacas com mastite subclínica analisadas, foram o *Staphylococcus spp* (15,07%), *Streptococcus agalactiae* (13,31%), Enterococcus (12,57%) e *S. uberis* (11,10%). Para as bactérias Gram negativas a de maior incidência isoladas nas amostras de leite foi *Escherichia coli* (11,10%).

CONCLUSÃO

Embora os dados sejam preliminares, conclui-se que o conhecimento do perfil de sensibilidade antimicrobiana é fundamental para a escolha do medicamento a ser utilizado no tratamento dos futuros casos de mastite clínica bovina e a técnica de PCR em tempo real permite detectar os microrganismos causadores de mastite subclínica permitindo maior agilidade na tomada de decisão quanto ao tratamento e controle de mastite em vacas com alta CCS.

SUPORTE FINANCEIRO: CNPq

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, M. A.; FILHO, F.C.D.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, P.T. Sensibilidade in vitro de *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite de vacas com mastite subclínica. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2000.

BRITO, M. A. V. P. **Diagnóstico microbiológico da mastite bovina. 2010.** Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/viewFile/7670/5443>>. Acesso em 21 de maio 2011.

ERSKINE R.J.; WALKER, R.D., BOLIN, C. A. Trends in antibacterial susceptibility of mastitis pathogens during a seven-year period. **J Dairy Sci**, 85, p.111-1118, 2002.

ESSLEMONT, D.; KOSSAIBATI, M. **Mastitis: how to get out of the dark ages.** Vet. J. 164:85-86. 2002.

GANDRA, E.A. **Multiplex PCR para Detecção de S. aureus, S. intermedius e S. hyicus em Leite UHT Artificialmente Contaminado.** Tese. Universidade Federal de Pelotas, Brasil. 69 p. 2006.

HARMON, R. J. **Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts.** Journal of Dairy Science, v.77, n.7, p.2103-2112, 1994

LUND-OLESEN, T.; DUFVA, M.; DAHL, J. A.; COLLAS, P.; HANSEN, M. F. **Sensitive on-chip quantitative real-time PCR performed on an adaptable and robust platform .** Biomedical Microdevices, V. 10, pp 769-776, 2008

MACHADO, T. R. O.; CORREA, M. G.; MARIN, J. M. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative Staphylococci isolated from mastitis cattle in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p. 278-282, 2008.

MULLER, E.E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SANTOS, G. T.; JOBIM, C. C.; DAMASCENO, J. C. Sul-Leite Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil, 2002, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM/CCA/DZO-NUPEL, 2002.

TAPONEN, S.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; SALONIEMI, H.; PYÖRÄLÄ, S. Bovine intramammary infections caused by coagulase-negative Staphylococci may persist throughout lactation according to amplified fragment length polymorphism based analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3301-3307, 2007.

VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. **Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers 2002.** Trends in Microbiology, v.10, pp15–21, 2002.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E.; BORNEMAN, J.; KEEN, N. T. **Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized.** Proceedings of the National Academy of Sciences. P. 3889–3894. 2001

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