

Heldeberto da Silva PEREIRA JUNIOR<sup>1</sup>, Raul Dirceu PAZDIORA<sup>2</sup>, Bruna Rafaela Caetano Nunes PAZDIORA<sup>3</sup>; Igor Mansur MUNIZ<sup>2</sup>, Marilene CADES<sup>4</sup>

## PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM CEPAS DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE LEITE MASTÍTICO BOVINO

**Palavras chave:**  
Mastite  
Antibiótico  
Gado

**RESUMO:** O leite é um dos produtos mais importantes na agropecuária nacional, rico em uma grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento. A maior doença na pecuária de leite é a mastite, podendo afetar a qualidade do leite e redução na produção. Visitou-se propriedades rurais na região do município de Rolim de Moura/RO. Avaliando um total de 128 vacas em lactação, com a realização do teste caneca do fundo preto e exame do CMT. Coletava-se amostras de leite com suspeita de mastite, sendo devidamente enviadas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e enviadas ao laboratório de Microbiologia Clínica Veterinária/UNIR para isolamento e pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos. Os resultados obtidos referentes ao teste da caneca de fundo preto e ao exame do CMT nas 128 vacas em lactação. Foi um total de 8 animais com mastite clínica ou. Em relação a mastite subclínica, as amostras negativas foram 56, as positivas 64 vacas das coletas realizadas. No teste de sensibilidade in vitro das oito amostras de mastite clínica obtidas, aos antimicrobianos foram: O antimicrobiano ao qual as cepas foram mais sensíveis foi a Cefalexina em 3 amostras, seguida por 2 amostras pela Gentamicina, sendo representadas com uma amostra de cada, a Ciprofloxacina, Norfloxacin e Ampicilina. Durante o estudo foi observada a resistência das cepas aos antimicrobianos Tetraciclina e Ceftriaxona. Com isso podemos concluir que tem a falta de boas práticas agropecuárias e um apoio técnico para que o produtor possa controlar tal enfermidade em seu rebanho.

## ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF STRAINS OF BACTERIA ISOLATED FROM BOVINE MILK MASTITIC

**Keywords:**  
Mastitis  
Antibiotic  
Cattle

**ABSTRACT:** Milk is one of the most important products in the domestic agriculture, rich in a lot of essential nutrient for growth. Most disease in dairy farming is mastitis, which may affect the quality of milk and reduction in production. Was visited farms in Rolim de Moura county region / RO. Evaluating a total of 128 lactating cows, with the completion of mug test black background and take the CMT. Is collected milk samples suspected of mastitis, properly being sent in isothermal boxes containing recyclable ice and sent to the microbiology laboratory Veterinary Clinic / UNITE for isolation and sensitivity to antimicrobial research. The results for the test black background mug and take the CMT in 128 lactating cows. It was a total of 8 animals with clinical mastitis or. In relation to subclinical mastitis, negative samples were 56, 64 positive cows collections made. In vitro susceptibility testing of the eight clinical mastitis samples obtained, the antibiotics: Antimicrobial to which the strains were more sensitive was Cephalexin in 3 samples, followed by 2 samples by gentamicin, being represented by a sample of each, the ciprofloxacin, Norfloxacin and Ampicillin. During the study we observed the resistance of the strains to Tetracycline and Ceftriaxone antimicrobials. With this we can conclude that there is a lack of good agricultural practices and technical support so that the producer can control this disease in your herd.

<sup>1</sup>Médico Veterinário, VB alimentos Ind. Com. Ltda ; <sup>2</sup>Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Rondônia, Campus de Rolim de Moura, RO, Brasil; <sup>3</sup>Docente do Curso de Zootecnia da Universidade Federal de Rondônia, Campus de Rolim de Moura, RO, Brasil; <sup>4</sup>Discente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Rondônia, Campus de Rolim de Moura, RO, Brasil.

\*Correspondência: heldebertomv@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O leite ocupa uma posição de destaque na economia brasileira, figurando entre os seis primeiros produtos mais importantes da agropecuária nacional. O agronegócio do leite e seus derivados desempenha um papel relevante no suprimento de alimentos e na geração de emprego e renda para a população brasileira. É um alimento rico em uma grande quantidade de nutrientes essenciais ao crescimento e a manutenção de uma vida saudável (Ribeiro et al., 2012). A produção de leite adquirida pelos laticínios estabelecidos no estado foi de 792.869 milhões de litros de leite, fazendo com que Rondônia seja responsável por 63% da produção de leite da Região Norte, o que torna o estado o maior produtor de leite desta região e oitavo maior produtor nacional de leite (IBGE, 2011). A mastite é uma das doenças de representação em vacas leiteiras e continua a ser a doença mais dispendiosa. Ele reduz a produção de leite e afeta a qualidade do leite em todos os países produtores de laticínios em todo o mundo. A incidência da mastite nos rebanhos causa perdas de produção, e na mastite subclínica pode custar a indústria de laticínios um grande prejuízo anual. A mastite é capaz de provocar a redução de até 45% na produção de leite, responsável por atingir vacas leiteiras, ocasionando a inflamação da glândula mamária (Bar et al., 2008). O problema pode provocar desde a diminuição na produção e perdas na qualidade do produto final, até problemas mais graves, como a morte do animal afetado e riscos à saúde humana (por meio de microrganismos e toxinas presentes no leite consumido) (Hertl et al., 2010). A mastite é causada, principalmente, devido à ação de bactérias, além de ser ocasionada pela infecção de fungos e vírus. A doença se apresenta de duas formas, sendo a forma clínica responsável por alterações no leite e anormalidades no úbere, destacando o aumento de temperatura e edema;

e a forma subclínica que não apresenta alterações visíveis a olho nu, porém, é mais frequente e causa até 40% de redução na produção de leite. Justamente por se desenvolver de formas diferentes é que a mastite necessita de tratamentos específicos, de acordo com o progresso da doença (Brito et al., 2011). A mastite subclínica é a forma mais comum de mastite e não é aparente, já que não há sinais visíveis da doença e o diagnóstico depende de testes como CMT e contagem de células somáticas (CCS). Vacas com mastite clínica passam por mudanças mais dramáticas na composição do leite e componentes quando comparadas às vacas com mastite subclínica. Conseqüentemente, a mastite subclínica muitas vezes não é detectada, resultando em infecções intramamárias persistentes, facilitando a disseminação de patógenos contagiosos e podendo levar à mastite clínica. A mastite subclínica é geralmente causada por uma variedade de patógenos Gram positivos (Koskinen et al., 2010). Tradicionalmente, o tratamento de casos subclínicos é realizado na última ordenha do período de lactação com antibióticos aprovados para uso em vacas secas. O tratamento durante a lactação tem sido controverso e é geralmente assumido como ineficaz. As estratégias de tratamento de mastite subclínica durante a lactação foram originalmente desenvolvidas para *Streptococcus agalactiae*, em diversos estudos o tratamento para esse agente foi considerado eficaz, apresentando 75 a 90% de cura bacteriológica, aumento na produção de leite e decréscimo dramático na CCS do tanque (Erskine, 2001). Entretanto, quando as mesmas estratégias foram aplicadas para outros patógenos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* spp. ambientais, os resultados foram desanimadores. Conseqüentemente, associando-se esses resultados com as perdas econômicas devido ao descarte do leite, há uma tendência ao não tratamento de casos subclínicos durante a lactação. Com isso,

animais infectados permanecem no rebanho, acarretando uma série de fatores (Shome et al., 2011). Este trabalho teve como objetivo, realizar um levantamento dos animais positivos para mastite clínica e a subclínica nas propriedades leiteiras de Rolim de Moura, analisar quais antibióticos não são mais eficazes no combate a mastite clínica, evitar a contaminação de outros animais e diminuir os prejuízos com a diminuição da produção pela doença.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram visitadas propriedades rurais na região do município de Rolim de Moura/RO. Avaliando um total de 125 vacas em lactação, com a realização do teste da caneca de fundo preto e CMT (California Mastitis Test).

Na hora da ordenha retirava-se os três primeiros jatos de leite da cada teta em uma caneca de fundo preto, que serve para diagnosticar a mastite clínica das matrizes que estão em lactação, possui sintomas que podem ser associados como: febre, diminuição da produção leiteira, vermelhidão das mamas, apatia do animal, edema, endurecimento e dor na glândula mamária. O procedimento foi realizado em todas as vacas ordenhadas pois é o leite que apresenta uma maior concentração bacteriana. Observando seu aspecto, assim se tivesse alterado, com presença de grumos, pus amarelo ou aquoso era um indicativo de diagnóstico de mastite clínica. Coletava-se amostras desse leite, após prévia lavagem do teta com água e sabão, secagem com papel toalha em condições assépticas. Coletando 5 mL de leite, em frascos com tampa rosqueável, esterilizados e previamente identificados com o nome ou número do animal e quarto mamário, sendo devidamente enviadas, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável ao laboratório de Microbiologia Clínica Veterinária/UNIR para isolamento e pesquisa de sensibilidade a antimicrobianos. Para a realizar as análises utilizou-se ágar Manitol Salgado (Agar Chapman – Himedia, Mumbai,

Índia), para bactérias Gram positivas e ágar Mac Conkey (Himedia, Mumbai, Índia), para bactérias Gram negativas que é um meio, seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de bacilos entéricos gram-negativos (enterobactérias e outros bastonetes gram-negativos) provenientes de amostras clínicas. Todas as amostras foram identificadas por número e semeadas em placa e incubadas a 37°C em aerobiose, em estufa bacteriológica por 24h. Uma vez que tal meio é seletivo e indicador para *Staphylococcus* sp., não foram considerados outros microrganismos. Amostras em que não foram observadas nas placas crescimento sugestivo de *Staphylococcus* sp. foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart infusion - Himedia, Mumbai, Índia) em tubos para enriquecimento por 24h a 37°C e posteriormente foram novamente semeadas em Agar manitol salgado. Foi realizada nova semeadura em Agar manitol salgado de todas as mostras para purificação das colônias. As colônias foram categorizadas de acordo com suas características macroscópicas.

Foram utilizadas suspensões bacterianas em solução salina estéril, ajustadas em turvação equivalente ao grau 0,5 da escala de McFarland e obtidas a partir de colônias isoladas após o crescimento em Agar Chapman (Himedia – Mumbai, Índia) e repicadas em meio ATS (Himedia – Mumbai, Índia) para então serem semeadas em placa contendo o meio Agar Muller Hinton (Himedia – Mumbai, Índia) para a realização do TSA pelo método de difusão de discos, de acordo com as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Resumidamente, pequenos discos comerciais (Laboratório Sansifar) de papel de filtro impregnados com concentrações conhecidas e pré-definidas (concentração plasmática que a droga alcança após administração sistêmica) de antimicrobianos foram colocados equidistantes na superfície do meio. As placas foram incubadas à 35°C (+ ou

– 2) por 24 horas, quando então foram medidos os halos de inibição de crescimento para cada antimicrobiano. De acordo com o tamanho desses halos, medidos com auxílio de halômetro e conferidos com a literatura (CLSI, 2010), as amostras foram classificadas como sensíveis ou resistentes.

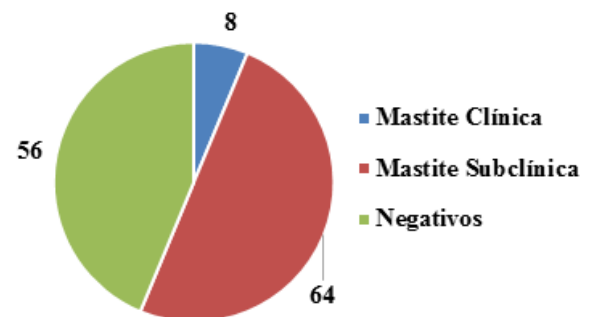
Para o presente estudo foram testados os antimicrobianos, tetraciclina (TET 30 mg), ampicilina (AMP 10 mg), norfloxacin (NOR 10 mg), cefalexina (CFE 30), ciprofloxacina (CIP 05), gentamicina (GEN 10), ceftriaxona (CRO 30).

Após o teste da caneca de fundo preto dando negativo passávamos para o CMT (California Mastitis Test), é um teste rápido e simples que estima a contagem de células somáticas (CCS) no leite de amostras individuais ou compostas dos quartos do animal o reagente do CMT é um detergente que possui um indicador de pH, por isso sua coloração é roxa. Quando o leite é misturado ao CMT em quantidades iguais, este reagente dissolve ou rompe a membrana das células de defesa (leucócitos) e o material genético (DNA) da célula é liberado. O DNA formará uma massa ou gel. Quanto maior o número de leucócitos, maior a quantidade de gel formada. O CMT deve ser feito com os primeiros jatos de leite, e a presença de sujeira, fezes e outras partículas não interfere no resultado do teste pois não há material genético de leucócitos. A mastite subclínica tem ausência de alterações visíveis, contudo, ocorre queda na produção.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos referentes ao teste da caneca de fundo preto e ao exame do CMT (California Mastitis Test) nas 128 vacas em lactação. Sendo em um total de oito animais com mastite clínica ou 6,25%. Em relação a mastite subclínica, as amostras negativas foram 56 ou 43,75%, as positivas 64 vacas ou 50% das coletas realizadas, como apresentado na figura 1.

No teste de sensibilidade in vitro das oito amostras de mastite clínica obtidas, aos antimicrobianos foram: O antimicrobiano ao qual as cepas foram mais sensíveis foi a Cefalexina com 3 amostras (37,5%), seguida por 2 amostras pela Gentamicina (25%), sendo representadas com uma amostra de cada, a Ciprofloxacina, Norfloxacin e Ampicilina (12,5%). Durante o estudo foi observada a resistência das cepas aos antimicrobianos Tetraciclina e Ceftriaxona como mostra a Tabela 1.



**FIGURA 1** Resultados de mastite clínica, subclínica e negativos de número de animais nas propriedades.

**TABELA 1** Eficiência dos antimicrobianos no tratamento de mastite clínica.

Antimicrobiano	Sensível	Resistente	%
Cefalexina	3/8	--	37,5%
Gentamicina	2/8	--	25,0%
Ciprofloxacina	1/8	--	12,5%
Ampicilina	1/8	--	12,5%
Norfloxacin	1/8	--	12,5%
Tetraciclina	--	1/8	0,0%
Ceftriaxona	--	1/8	0,0%

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que por meio da falta de implantação de boas práticas agropecuárias e um apoio técnico para que o produtor possa controlar a mastite nos rebanhos leiteiros constitui uma importante etapa para a obtenção de produtos lácteos de alta qualidade, além de aumentar a segurança do leite produzido no estado. Pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, cada vez mais há o desenvolvimento de resistência a estes, levando ao insucesso no tratamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAR D, TAUER LW, BENNETT G, GONZALEZ RN, HERTL JA, (2008) **The cost of generic clinical mastitis in dairy cows as estimated by using dynamic programming.** *J Dairy Sci* 91: 2205–2214.
- BRADLEY AJ, LEACH KA, BREEN JE, GREEN LE, GREEN MJ (2007) **Survey of the incidence and a etiology of mastitis on dairy farms in England and Wales.** *Vet Rec* 160: 253–257.
- CABRERA-RUBIO R, COLLADO MC, LAITINEN K, SALMINEN S, ISOLAURI E, (2012) **The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery.** *Am J Clin Nutr* 96: 544–551.
- CHEN H, JOGLER M, ROHDE M, KLENK HP, BUSSE HJ, (2012) **Reclassification and emended description of *Caulobacter leidy* as *Sphingomonas leidy* comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*.** *Int J Syst Evol Microbiol* 62: 2835–2843.
- EBERL G, LOCHNER M (2009) The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol* 2: 478–485.
- HAMADY M, WALKER JJ, HARRIS JK, GOLD NJ, KNIGHT R (2008) Error-correcting barcoded primers for pyrosequencing hundreds of samples in multiplex. *Nat Methods* 5: 235–237.
- HERTL JA, GROHN YT, LEACH JD, BAR D, BENNETT GJ, (2010) **Effects of clinical mastitis caused by gram-positive and gram-negative bacteria and other organisms on the probability of conception in New York state Holstein dairy cows.** *J Dairy Sci* 93: 1551–1560.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Banco de dados Agregados. 2011. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/default.asp?t=2&z=>
- o=1&u1=1&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1&u8=1&u9=1&u10=1&u11=1&u12=3&u13=1&u14=26674&u15=1&u16=1>. Acesso em: 17 Abril 2014.
- KOSKINEN MT, WELLENBERG GJ, SAMPIMON OC, HOLOPAINEN J, ROTHKAMP A, (2010) **Field comparison of real-time polymerase chain reaction and bacterial culture for identification of bovine mastitis bacteria.** *J Dairy Sci* 93: 5707–5715.
- LIM, ZHOU M, ADAMOWICZ E, BASARAB JA, GUAN LL (2012) **Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis.** *Vet Microbiol* 155: 72–80.
- MARTIN R; NAUTA AJ; BEN AMOR K; KNIPPELS LM; KNOL J. (2010) Early life: Gut microbiota and immune development in infancy. *Benef Microbes* 1: 367–382.
- NAWROCKI EP, EDDY SR (2007) **Query-dependent banding (QDB) for faster RNA similarity searches.** *PLoS Comput Biol* 3: e56
- NORMAN HD, MILLER RH, WRIGHT JR, WIGGANS GR (2000) **Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement.** *J Dairy Sci* 83: 2782–2788
- RANIERI ML, IVY RA, MITCHELL WR, CALL E, MASIELLO SN, (2012) **Real-time PCR detection of *paenibacillus* spp. in raw milk to predict shelf life performance of pasteurized fluid milk products.** *Appl Environ Microbiol* 78: 5855–5863.
- SHOME BR, DAS MITRA S, BHUVANA M, KRITHIGA N, VELU D, (2011) **Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens.** *J Appl Microbiol* 111: 1349–1356.
- WANG Q, GARRITY GM, TIEDJE JM, COLE JR (2007) **Naive bayesian classifier for rapid assignment of**

**rRNA sequences into the new bacterial taxonomy.** *Appl Environ Microbiol* 73: 5261–5267.

WRIGHT ES, YILMAZ LS, NOGUERA DR (2012) DECIPHER, a search-based approach to chimera identification for 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 78: 717–725.