

ETIOLOGIA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DO LEITE DE OVELHA NO FINAL DA LACTAÇÃO E ANÁLISE COMPARATIVA DO CMT E CONTAGEM DE MESOFILOS AERÓBIOS

ETIOLOGY AND SENSITIVITY OF ANTIMICROBIAL MILK SHEEP AT THE END OF LACTATION AND COMPARATIVE ANALYSIS THE CMT AND COUNTING AEROBIC MESOPHILIC

¹TONET, A.B; ²STURION, T.T., ³SILVA, F.C.

¹ Médico Veterinário Autônomo

² Docente do curso de Medicina Veterinária –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

³ Discente do curso de Medicina Veterinária –Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

No Brasil o rebanho ovino representa cerca de 17.380.581 animais, sendo uma grande atividade econômica, a sua leite tem grande importância em locais menos favorecidos por apresentar um leite muito nutritivo, os objetivos desse estudo são o isolamento, identificação e caracterização das bactérias presentes no leite de ovelhas de corte e a avaliação da sensibilidade a antibióticos. Os métodos utilizados para avaliação foram o CMT para diagnóstico de mastite subclínica, contagem de mesófilos aeróbios para quantificação de bactérias e para identificação e caracterização das bactérias presentes foram realizadas diferentes métodos como: tamanho, aspecto, borda, superfície, presença de hemólise, catalase, coloração de Gram, citologia e coagulase. Para a sensibilidade a antibióticos foi realizado o método de difusão de disco em ágar. Os índices de sensibilidade aos antibióticos foram muito baixos, provando que a resistência das bactérias ao uso demorado de antibióticos vem acontecendo com frequência .

Palavras-chave: Atividade Econômica. Bactéria. Diagnóstico, Antibióticos.

ABSTRACT

In Brazil the sheep flock is about 17,380,581 animals, being a major economic activity, your milk has great expressiveness in local disadvantaged by presenting a very nutritious milk, the objectives of this study are the isolation, identification and characterization of bacteria present in the milk of sheep cutting and assessment of antibiotic sensitivity. The methods were used to evaluate the diagnostic CMT subclinical mastitis, aerobes counting for quantification of mesophilic bacteria and for identification and characterization of bacteria present different method was: performed as size, aspect rim surface hemolysis, catalase, staining gram, cytology and coagulase. For antibiotic sensitivity was performed disk diffusion method on agar. The rate of antibiotic sensitivity were low, proving that the resistance of bacteria to the overuse of antibiotics has been happening frequently.

Keywords: Economic Activity. Bacteria. Diagnosis. Antibiotics.

INTRODUÇÃO

Os ovinos tem seu primeiro relato de existência há mais de 10.000 anos, hoje são encontradas em todos os países do mundo tendo a China com cerca de 284.728 milhões de cabeças com a maior população de ovinos do mundo (HAENLEIN, 2007). O Brasil possui cerca de 17.380.581 ovinos, onde o estado de São Paulo possui 476.253 ovinos (ANUALPEC, 2012).

O leite ovino possui grande importância em regiões menos favorecido por ser um alimento nutritivo, o leite ovino possui como característica branco ou com cor

de porcelana, apresenta maior concentração de extrato seco total, viscosidade e maior rendimento que o leite de vaca, sendo ideal para a produção de queijos, a média de produção das ovelhas brasileiras é cerca de 0.646 mL/leite/dia (PELLEGRINI, 2012; LUQUET, 1985; CORRÊA et. al. 2006).

A mastite subclínica é uma das principais enfermidades que atinge o rebanho de leite, pois não apresenta sinais clínicos, acometendo diversos animais sem alterações visíveis, com redução no volume de leite produzido, o estafilococos coagulase negativa é a principal bactéria isolada nos casos de mastite subclínica (LÍBERA, 2007; LUCHEIS, 2010; KANH, 2008).

Para o diagnóstico da mastite subclínica o CMT (California Mastitis Test) é um teste que irá ocorrer reação com as células somáticas, ocorrendo a formação de gel, quanto mais a viscosidade maior a quantidade de células somáticas, o resultado é expresso de forma em escala de um a cinco, sendo: 0 sem formação de gel; + leve formação de gel (fracamente positiva) ; ++ reação fracamente positiva; +++ fortemente positiva. A leitura é realizada por quarto mamário (PAMPLONA, 2003).

Cerca de 70 a 90% dos ovinos submetidos a tratamentos com antibióticos como amoxicilina, estreptomicina, penicilina e penicilina G procaína por via intramamária chegam à cura da afecção mamária (KANH, 2008).

O presente trabalho tem como objetivo realizar a comparação do Califórnia Mastitis Test (CMT) com a contagem de mesófilos aeróbios e a etiologia e a sensibilidade antimicrobiana das bactérias presentes no leite de ovelha no final de lactação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Hospital Veterinário das Faculdades Integradas de Ourinhos. Foram incluídos neste experimento 24 ovinos fêmeas em período final de lactação, independente do número de lactações e do número de crias do período de lactação, sem sinais clínicos de mastite.

As amostras foram coletadas após antissepsia dos tetos com álcool 70°GL e remoção com gaze estéril, realizou de ordenha manual e os dois primeiros jatos foram descartados, após foi realizado o teste de CMT e anotados os dados em planilha específica, para a realização da contagem de mesófilos aeróbios o leite dos dois tetos foram armazenados em frascos com capacidade de cinco mililitros de vidro estéril. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de

Microbiologia do Hospital Veterinário das Faculdades Integradas de Ourinhos – FIO, onde foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

Para as análises laboratoriais, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente, após foram realizado a inoculação de superfície em Agar sangue a 5% de carneiro desfibrinado, e incubado a 37°C durante 24 horas.

Após a incubação foi realizado a identificação e caracterização morfológica das colônias, provas bioquímicas e identificação citológica e tintorial pela coloração de Gram.

Para a realização da contagem de mesófilos aeróbios foi realizado o método de diluição decimal, em que é diluído um mililitro de leite em nove mililitro de água peptonada 0,5 %, sendo considerada está diluição 1/10, na sequência foram realizadas diluições de 1/100 e 1/1000. Após a diluição, foi inoculado 0,1mL em ágar plate count, e incubação por 24horas a 37°C .

Para contagem das unidades formadoras de colônias, foram utilizadas apenas as placas que possuíam de 30 a 300 colônias, após o resultado foi expresso pela multiplicação do total de colônias pela diluição.

A técnica de antibiograma utilizada foi a difusão de disco em ágar Mueller Hilton realizado de acordo com a metodologia descrita por (BAUER et al.1966 apud QUINN et al.1994)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 24 amostras analisadas no experimento 100% das análises apresentaram isolamento bacteriano, a maior incidência foi de *Staphylococcus spp.* em cerca de 60% das amostras, a *E.coli* e *Salmonela spp.* em 25%, *Bacilos spp.* e *Corynebaterium spp.* em 20.84% e *Proteus spp.* com 8,33%. Como já observado em estudo de Coutinho et al. (2006), onde o *Staphylococcus spp.* foi o mais incidente com 57.6% do total de colônias.

Conforme estudos realizados por Domingues et al. (2006), Guaraná et al. (2007) e Zafalon et al. (2010) que realizaram isolamento bacteriano do leite de ovelhas, seus resultados foram de *Staphylococcus* coagulase negativo próximos de 70%, diferente aos resultados encontrados por Coutinho et al., (2006) foi de 57.6% e de Lucheis; Hernandez, Trocarelli (2010) que obteve resultado de 25.4%.

No presente estudo o *Corynebacterium spp.* esteve presente em 20.84% das amostras, diferente aos resultados obtidos por Domingues et al (2006) com

incidência foi de 5.7%, Lucheis; Hernandes, Trocarelli (2010) de 6.7% e Zafalon et al (2010) com presença em apenas 0.4% das amostras.

Em estudo de Domingues et al. (2006) a incidência de *Proteus spp.* foi de 3.8% neste trabalho foi de 8.33%.

Tabela 1 - Frequências de espécies de bactérias isoladas a partir de amostras de leite de ovelhas.

Espécie	Frequência	(%)
<i>Staphylococcus spp.</i>	15	62,50%
<i>Corynebacterium spp.</i>	5	20,84%
<i>E. coli</i>	6	25,00%
<i>Salmonella spp.</i>	6	25,00%
<i>Bacilos spp.</i>	5	20,84%
<i>Proteus spp.</i>	2	8,33%

No presente estudo, a gentamicina teve cerca de 50,00% de sensibilidade sobre o diferente grupo de bactérias, estes resultados são menores aos encontrados por Zafalon et al. (2010) que obtiveram cerca de 92.5%, Silva et al. (2010) obteve 100% de sensibilidade e Domingues et al. (2006) obtiveram 63,4% de sensibilidade em relação às *Staphylococcus spp.* e 41,6% dos *Corynebacterium spp.*

Conforme Zafalon et al. (2010) que avaliaram a sensibilidade dos *Staphylococcus spp.* e *Corynebacterium spp.* à Penicilina G, apresentou 23,2% e 25,0% respectivamente, já Coutinho et al., (2006) para *Staphylococcus* coagulase negativa e *Staphylococcus aureus* apresentaram sensibilidade de 57,9% e de 20% respectivamente, diferente aos resultados encontrados ao mesmo antibiótico que foi de apenas 12,50% para todos as bactérias .

Em experimento realizado por Silva et al. (2010) os *Staphylococcus* coagulase negativa foi sensível 91.7% à penicilina, diferente aos resultados obtidos por Domingues et al. (2006), que apenas 23.2% dos *Staphylococcus spp.* e 25% dos *Corynebacterium spp.* foram sensíveis a penicilina.

Diferente dos resultados obtidos por Lucheis et al. (2010), a sensibilidade a ampicilina foi de 74.1% aos *Staphylococcus* coagulase negativo, no presente estudo não houve sensibilidade a este agente.

No presente experimento a sensibilidade das bactérias isoladas foi de 32,3% para a tetraciclina, resultados parecidos foram obtidos por Lucheis et al. (2010) com

os *Staphylococcus* coagulase negativo testados a sensibilidade foi de 32,3%, diferentemente aos resultados obtidos por Domingues et al., (2006) que demonstrou a sensibilidade de 63.4% da tetraciclina em relação à *Staphylococcus spp.* e a sensibilidade de 20.8% dos *Corynebacterium spp.*

Estudo realizado por Silva et al. (2010) a cefalotina foi eficiente em 100% dos *Staphylococcus* coagulase negativo isolados, diferem aos resultados do presente estudo, onde a eficiência foi de apenas 37.5%.

Segundo Domingues et al. (2006) a cefalexina teve atuação em 79.5% dos *Staphylococcus spp.*, e de apenas 37.5% sobre os *Corynebacterium spp.* resultados próximos foram encontrados no presente experimento quando comparado aos *Corynebacterium spp.*

Em estudo realizado por Coutinho et al. (2006) o *Staphylococcus* coagulase negativo foram sensíveis a neomicina em 47.4% das amostras, resultados diferente dos obtidos por Silva et al. (2010) para o mesmo antibióticos, onde 100 % das amostra foram sensíveis ao mesmo, já em experimento de Lucheis, et al. (2010) 72.9% dos *Staphylococcus spp.* foram sensíveis a neomicina.

Segundo Lucheis et al. (2010) o sulfazotrim teve eficiência em 43.5% das amostras, em estudo de Silva et al. (2010) obteve 91,7% e Coutinho et al. (2006) com 68.4% aos *Staphylococcus spp.*

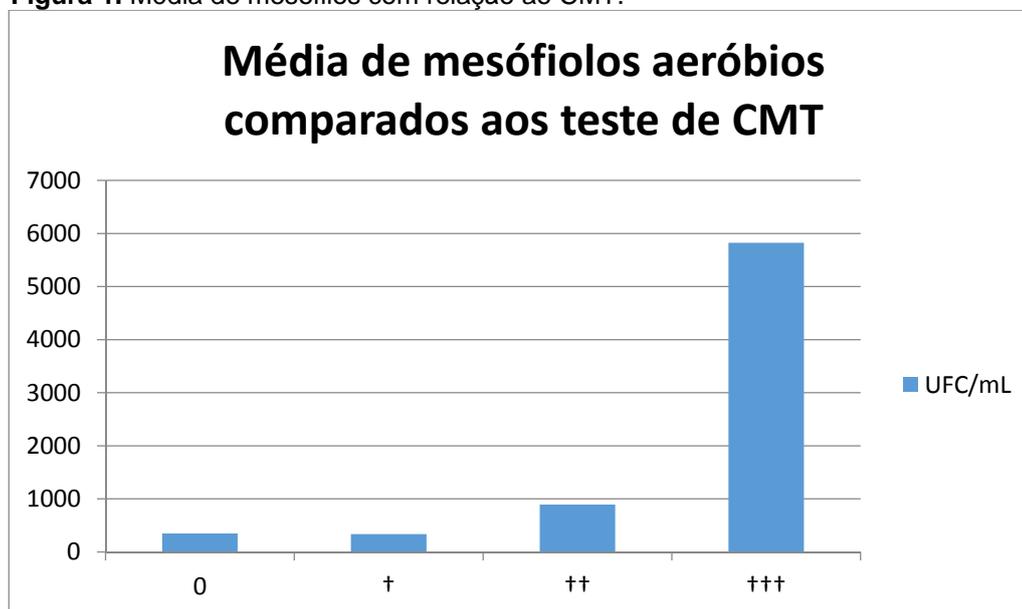
As diferentes bactérias isoladas no presente estudo apresentaram 58,33% de sensibilidade à estreptomicina, resultados diferentemente foram obtidos por Silva et al. (2010) onde todas as amostras foram resistentes ao mesmo antibiótico.

Tabela 2. Perfil de sensibilidade dos micro-organismos isolados de amostras de leite de ovelhas de diversas raças.

Agente antimicrobiano	Concentração	Resistentes		Intermediários		Sensível	
		Freq.	(%)	Freq.	(%)	Freq.	(%)
Estreptomicina	10 µg	9	37,50	1	4,17	14	58,33
Tetraciclina	30 µg	10	41,67	5	20,83	9	37,50
Sulfonamidas	300 µg	21	87,50	1	4,17	2	8,33
Gentamicina	10 µg	11	45,83	1	4,17	12	50,00
Ampicilina	10 µg	23	95,83	1	4,17	0	0,00
Cefalotina	30 µg	12	50,00	3	12,50	9	37,50
Penicilina	10 µg	20	83,33	1	4,17	3	12,50
Cefalexina	30 µg	13	54,17	2	8,33	9	37,50
Neomicina	30 µg	10	41,67	5	20,83	9	37,50

A estreptomicina foi o antimicrobiano que apresentou maior efetividade dentre os antimicrobianos seguidos por gentamicina (50%), cefalotina (37.50%), cefalexina (37.50%), neomicina (37.50%) e a tetraciclina (37.50%). Por outro lado, os maiores índices de resistência foram da penicilina (83,33%), sulfonamidas (87.50%) e a ampicilina (95.83%).

Figura 1. Média de mesófilos com relação ao CMT.



A relação do mesófilo com CMT foi de animais, com o CMT 0 a media de mesofilo foi de 347,7 UFC/mL, animais com + a média de mesofilo foi de 893 UFC/ML, em ++ a média foi de 335,8 UFC/mL, com +++ a media de mesófilo foi de 5.825 UFC/mL.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados pode-se concluir que nenhum dos antibióticos foi totalmente eficaz sobre as bactérias presentes no leite de ovelhas no final de lactação, devendo assim ser realizado monitoramento periódico das bactérias presentes no leite, para escolha do melhor antibiótico, e que o teste de CMT possui relação com os valores de contagem de mesófilos aeróbios.

REFERÊNCIAS

- BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by standardised single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.
- BELLA LÍBERA, A.M.M.P., AZEVEDO, M.R., BLAGITZ, M.G. Mastite de Pequenos Ruminantes. In: LANGONI, H., RIBEIRO, M.G., SANTOS, M.V., DOMINGUES, P.F., PINTO, J.P.A.N., NADER FILHO, A. **Anais...** do 4º Encontro de pesquisadores em Mastites. Botucatu : FMVZ – UNESP, 2007. p. 64-73.
- COUTINHO, D.A.; COSTA, J.N.; RIBEIRO, M.G.; TORRES, J.A. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas de ovelhas da raça Santa Inês com mastite subclínica. v.7 Rev. Bras. Saúde Prod. An., p. 139-151, 2006.
- CORRÊA, G.F.; OSÓRIO, M. T. M.; KREMER, R. et al. **Produção e Composição Química Do Leite em Diferentes Genótipos Ovinos**. Revista Ciência Rural. Santa Maria, v.36. n.3. 2006.
- DOMINGUES, P. F.; LUCHEIS, S. B.; SERRÃO, L. S.; FERNANDES, S.; CONTENTE, A. P. A., MARTINS, E. C. V, LANGONI, H. Etiologia E Sensibilidade Bacteriana Da Mastite Subclínica Em Ovelhas Da Raça Santa Inês.: **Ars veterinária**,. Jaboticabal SP, v. 22, 2006.
- GUARANÁ.E.L.D.S.; SANTOS.R.A.; SILVAN.D.S.; SIQUEIRA CAMPOS A.G.S.; AFONSO J.A.B.; Mendonça.C.L **INFLUÊNCIA DA MASTITE SUBCLÍNICA SOBRE AS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE DE OVELHAS SANTA INÊS EM DIFERENTES FASES DA LACTAÇÃO: ESTUDO PRELIMINAR** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (MCT/CNPq – Edital Universal-15/2007), pelo apoio financeiro.2007.
- HAENLEIN G.F.W., WENDORFF W.L. **Sheep Milk: Production and Utilization of Sheep Milk**. In: **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK and Ames, Iowa, USA, p.137-194, 2006.
- KANH C.M.(org). **Manual Merck de Veterinária**. 9. Ed. São Paulo: Roca, 2008.

LUCHEIS, S.B., HERNANDES G.S. M.Z. Troncarelli. **Monitoramento Microbiológico Da Mastite Ovina Na Região De Bauru, SP.** 77.vol. São Paulo SP:Arquivo Institucional Biologia ,2010.

LUQUET, F.M. **O Leite, do Úbere a Fábrica de Lacticínios.** Primeiro volume. Coleção Euroagro. Publicações Europa – América. v 2. 1985.

PAMPLONA,R.R. **Manual de Produtos Veterinários MPV – Veículo Oficial do SINDAN.** Ministério da Agricultura e Abastecimento. 4 Ed. Revisada e Ampliada. Robe Editorial. 2003.

PELLEGRINI. L.G. **Caracterização do leite de ovino em função do período de lactação.** Dissertação do mestrado, Santa Maria RS, 2012.

QUIN P.J, CARTER M.E, MARKEY.B,CARTER.G. **Clinical Veterinary Microbiology.** Ed Wolfe. 1994.

SILVA, N.S.; SILVEIRA J.A.S.; PINHEIRO C.P.; SOUSA M.G.S.; OLIVEIRA C.M.C.;MENDONÇA C.L.; DUARTE M.D; BARBOSA J.D. **Etiologia e perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de ovelhas com mastite na região nordeste do estado do Pará.** 1.ed. Central de Diagnóstico Veterinário (Cedivet), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA),2010.

ZAFALON,L.F.; ESTEVES,S.N.; MACHADO,R.; MARTINS,K.B; DIAS,W.A.F. **Microbiologia do leite de ovelhas em rebanho de corte.** 1.ed São Carlos SP: Embrapa, 2010.

