

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE COLHIDAS DE VACAS EM
LACTAÇÃO DA REGIÃO SERRANA DO RIO GRANDE DO SUL

Autora: Carmela Piccoli

PORTO ALEGRE

2014/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMOSTRAS DE LEITE COLHIDAS DE VACAS EM
LACTAÇÃO DA REGIÃO SERRANA DO RIO GRANDE DO SUL**

Autora: Carmela Piccoli

Orientadora: Marisa Cardoso

Co-orientadora: Thais de Campos

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Veterinária
como requisito parcial para a obtenção de
graduação em Medicina Veterinária**

PORTO ALEGRE

2014/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, que nunca mediram esforços para me ajudar, e com certeza, essa conquista é nossa, pois o apoio e dedicação durante essa jornada foi fundamental. Ao meu namorado, Mateus Cavalcanti, por ter estado do meu lado nos momentos mais difíceis, sempre fazendo de tudo para me tranquilizar.

Agradeço também às minhas grandes amigas e colegas de profissão, Karina, Renata, Ana Gomes, Ana Berreta, Liége, Rafaela, Gabriela e Patrícia, por terem tornado cada momento especial ao longo desses anos de graduação. Também sou muito grata a todos os colegas do laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, por todo o auxílio durante o meu trabalho, com certeza, vocês foram essenciais para a minha formação. À minha professora e orientadora, Marisa Cardoso, por ter me dado a oportunidade de fazer este trabalho, pela orientação e por todos os ensinamentos que levarei para toda a minha vida.

RESUMO

A mastite é considerada a principal doença que afeta a bovinocultura mundial, ocasionando as maiores perdas econômica na produção leiteira, pela redução da produtividade e da qualidade do leite. A infecção pode se apresentar na forma clínica ou subclínica de acordo com o tipo de agente causador. Para o correto diagnóstico e controle da mastite existem algumas ferramentas básicas como: a contagem de células somáticas (CCS), de extrema importância para o monitoramento da mastite subclínica; e a cultura bacteriológica, considerada o diagnóstico padrão e que auxilia a escolha do tratamento antimicrobiano. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar as principais bactérias encontradas na glândula mamária de vacas em lactação em propriedades de uma cooperativa da região serrana do Rio Grande do Sul e avaliar a sua resistência frente a alguns antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite. Foram coletadas 408 amostras, em seis propriedades rurais pertencentes à uma cooperativa, localizada na serra gaúcha, em dois meses consecutivos. Na análise microbiológica, os agentes mais isolados em ambas as coletas foram: *Staphylococcus coagulase negativa* e *Corynebacterium bovis*, sendo este último micro-organismo considerado oportunista e relacionado com falhas na higiene. Em relação aos agentes contagiosos, *Staphylococcus aureus* foi o único microrganismo isolado nas amostras estudadas. Os estreptococos ambientais também foram encontrados, no entanto em menor frequência que os demais. A resistência dos patógenos contra oito antimicrobianos foi testada através do método de disco difusão em ágar. A maioria das cepas de *S. aureus* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados, enquanto SCN apresentaram elevada frequência de resistentes à ampicilina. Em relação aos estreptococos ambientais, houve baixa suscetibilidade aos antimicrobianos testados. Devido à importância da mastite bovina, conclui-se que é necessária a implantação de métodos de controle e prevenção desta enfermidade nas propriedades estudadas.

Palavras-chave: mastite bovina, agentes bacterianos, amostras de leite.

ABSTRACT

Mastitis is considered the leading disease affecting cattle industry worldwide, being the major cause of economic losses in dairy production by reducing productivity and milk quality. The infection can occur in the clinical or subclinical form according to the type of causative agent. For a correct diagnosis and control of mastitis there are some basic tools such as the somatic cell count (SCC), which is of extreme importance for the monitoring of subclinical mastitis; and the bacteriological cultures, considered the standard diagnostics that also helps the choosing of antimicrobials for treatment. Therefore, this study aimed to investigate the bacteria found in the mammary gland of lactating cows in properties of a cooperative in the Serra region of Rio Grande do Sul and to evaluate its resistance against some antibiotics used to treat mastitis. A total of 408 samples was collected in six dairy farms associated to the cooperative in two consecutive months. On the microbiological analysis, the most common agents isolated in both samplings were: coagulase-negative Staphylococcus and Corynebacterium bovis, the latter microorganism considered opportunistic and associated with hygienic failures. Regarding the infectious agents, Staphylococcus aureus was the single organism isolated from the studied samples. Environmental streptococci were also isolated, however in a lower frequency. The resistance of pathogens against eight antimicrobial agents was tested by the disk agar diffusion method. Most strains of S. aureus were susceptible to all antimicrobials tested, while coagulase-negative Staphylococci showed high frequency of resistance to ampicillin. Regarding environmental streptococci, there was a low susceptibility against the antimicrobials tested. Due to the importance of bovine mastitis, we concluded that methods for control and prevention of this disease should be started in the sampled dairy farms.

Keywords: bovine mastitis, bacterial agents, milk samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Placa de ágar sangue apresentando o teste de CAMP. *Streptococcus agalactiae* apresenta alteração característica em ponta de flecha..... 18
- Figura 2 - Mastite causada por *Escherichia coli*. Alterações visíveis no leite (presença de grumos e aspecto aquoso).20
- Figura 3 - Produtos da RFLP-PCR em gel de agarose 1,5%. Controles positivo e negativo estão apontados na figura; marcador de 100 pares de base (pb). A amostra 6 apresenta a amplificação do gene *pta* (320 pb) e a clivagem com enzima *mbo1*, resultando em fragmentos de restrição em 156 pb e 164 pb, formando uma única banda aparente, devido à proximidade dos locais de clivagem. As demais amostras não apresentaram resultados conclusivos na identificação.27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micro-organismos isolados na primeira coleta de amostras de leite realizadas em seis propriedades da Serra do Rio Grande do Sul.	25
Tabela 2 - Agentes isolados na segunda coleta das amostras de leite de Veranópolis e	26
Tabela 3 - Resistência à antimicrobianos apresentada por bactérias isoladas da glândula mamária de vacas em lactação de seis propriedades da Serra gaúcha.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

CCS -Contagem de células somáticas

NMC–*National Mastitis Council*

CMT -*California Mastitis Test*

SCN –*Staphylococcus* coagulase negativa

SCP–*Staphylococcus* coagulase positiva

uL -microlitros

µg - microgramas

MRSA- *Staphylococcus* resistente a metilina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Mastite.....	12
2.2	Agentes Bacterianos Causadores de Mastite.....	13
2.2.1	Gênero <i>Staphylococcus</i>	13
2.2.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.2.1.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	15
2.2.1.3	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa.....	16
2.2.2	Gênero <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i>	16
2.2.2.1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	17
2.2.2.2	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i>	18
2.2.2.3	<i>Streptococcus uberis</i>	18
2.2.2.4	<i>Streptococcus equinus</i>	18
2.2.3	Coliformes.....	19
2.2.3.1	<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	19
2.2.4	<i>Serratia</i> sp.....	20
2.2.5	<i>Corynebacterium</i> sp.....	21
2.3	Contagem de Células Somáticas.....	21
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5	CONCLUSÃO.....	32
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

A mastite é a principal afecção que atinge o rebanho leiteiro causando prejuízos tanto ao produtor quanto à indústria. Os impactos econômicos decorrem da queda na produção leiteira, perda da qualidade do leite, aumento do custo de produção e descarte prematuro de vacas por perda de um ou mais quartos mamários, que se tornam fibrosos e improdutivos. Sua magnitude varia conforme a intensidade do quadro e o agente causador.

Na indústria de laticínios, esta enfermidade é responsável pela queda no rendimento dos derivados lácteos, especialmente os queijos, contribuindo, também, para a redução da vida de prateleira dos produtos, incluindo o leite pasteurizado. Além disso, a possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas via leite, ou transferência de resíduos de antibióticos, representa risco à saúde pública (FORSYTHE, 2002).

O Brasil destaca-se como o sexto maior produtor mundial de leite, tendo atingido, em 2011, a produção de 26,1 bilhões de litro (IBGE, 2012). Porém, devido à alta prevalência de mastite no rebanho brasileiro, estima-se perda média de 15% na produção, o que representa cerca de 3,3 bilhões de litros ao ano (SANTOS; FONSECA, 2007).

Na última década, a produção brasileira apresentou incremento significativo, porém, apesar do avanço tecnológico observado na bovinocultura de leite, há necessidade de melhoria na qualidade da matéria prima, o que contribuirá para o desenvolvimento e consolidação da indústria de laticínios no Brasil. A melhoria na matéria prima depende, entre outros fatores, do correto diagnóstico e prevenção da mastite.

Dentre as ferramentas básicas para o diagnóstico e controle da mastite estão: o monitoramento da Contagem de Células Somáticas (CCS), onde a infecção intramamária é a causa principal de seu incremento (HARMON,1994); e a investigação microbiológica do leite. Essa é considerada o diagnóstico padrão para a mastite, pois além de identificar o patógeno, auxilia na escolha do tratamento antimicrobiano mais adequado, outro ponto importante para a adoção de medidas de controle e prevenção (SANTOS; FONSECA, 2007). O antimicrobiano adotado deve ter como principais objetivos a eficácia terapêutica e o ganho econômico, trazendo como consequências, o aumento da produção e a redução das fontes de infecção. Para que ocorra a resolução da mastite, é importante que o fármaco escolhido atinja concentrações acima ou igual à concentração inibitória mínima (CIM) no úbere (BENEDETTE et al., 2008). Portanto, a investigação periódica das bactérias presentes na glândula mamária, bem como seu perfil de resistência, em bovinos de uma determinada bacia leiteira contribui para traçar um cenário da situação e planejar medidas a serem implantadas.

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo investigar as principais bactérias encontradas na glândula mamária de vacas em lactação em propriedades da uma cooperativa da região serrana do Rio Grande do Sul e avaliar a sua resistência frente a alguns antimicrobianos utilizados no tratamento de mastite.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mastite

Mastite é a inflamação do parênquima da glândula mamária; casos de mastite infecciosa podem ser causados por bactérias, fungos, leveduras e algas (PHILPOT; NICKERSON, 2002; RADOSTITS et al., 2007). As bactérias são o agente etiológico mais importante. A partir do momento em que as bactérias invadem a glândula mamária e iniciam a multiplicação, o quadro de mastite está estabelecido. A invasão pode ocorrer de diferentes maneiras, como: através da colonização da pele e do canal do teto entre as ordenhas; oscilação do vácuo que impulsiona os microrganismos para o interior do teto; ou, também, pela utilização de cânulas contaminadas no tratamento intramamário. Após a invasão, ocorre intensa migração de leucócitos do sangue para o leite, além de alterações de permeabilidade vascular e outros sinais de inflamação (SANTOS; FONSECA, 2007).

A infecção pode ser classificada em dois tipos principais, quanto à sua forma de manifestação:

- Mastite clínica, que é caracterizada por alterações visíveis no úbere tais como rubor, aumento de volume, endurecimento e dor quando palpado. Há também alterações no leite, como aparecimento de grumos, pus ou sangue. É possível, também, que o quadro de mastite clínica seja acompanhado por manifestações sistêmicas, como desidratação, aumento da temperatura retal, diminuição do consumo de alimento e da produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2007).
- Mastite subclínica, onde não são observadas anormalidades visíveis no úbere ou no leite. No entanto, é possível perceber uma redução na produção e alterações na composição do leite como o aumento da CCS, dos teores de cloro, sódio e diminuição dos teores de caseína, lactose e gordura. Como a forma subclínica não apresenta sinais evidentes da doença, são necessários testes para auxiliar no seu diagnóstico, tais como: *California Mastitis Test* (CMT), *Wisconsin Mastitis Test* (WMT), condutividade elétrica do leite e contagem de células somáticas (CCS). Considera-se que a mastite subclínica seja entre 15 e 40 vezes mais prevalente que a forma clínica. É considerada mais importante pelo fato de causar perdas econômicas devido à diminuição da produção e à alteração da composição do leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Também é possível classificar as mastites quanto ao tipo de agente causal em ambiental, contagiosa e oportunista. Os microrganismos ambientais encontram-se no

ambiente onde vivem as vacas e invadem a glândula mamária no intervalo entre ordenhas, quando os tetos ficam expostos à lama, fezes e sujidades. Já os patógenos contagiosos são disseminados a partir dos quartos infectados para os não-infectados. Geralmente a transmissão ocorre durante o processo da ordenha, por teteiras, pelas mãos dos ordenhadores e panos utilizados em vários animais durante a higienização. Há também os patógenos oportunistas, que são os mais predominantes; no entanto causam apenas uma leve inflamação, sendo assim, menos importantes. Estes são encontrados na superfície do úbere e dos tetos. Outros microrganismos menos comuns são os fungos, leveduras e algas (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

2.2 Agentes Bacterianos Causadores de Mastite

Há uma grande diversidade de micro-organismos causadores de mastite, no entanto as bactérias são as mais frequentemente envolvidas. As bactérias Gram positivas, principalmente dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* contribuem com mais de 80% das ocorrências.

2.2.1 Gênero *Staphylococcus*

Atualmente, mais de 50 espécies e subespécies são conhecidas (GYLES et al., 2010). Este microrganismo é encontrado, principalmente, na pele e mucosas de animais, incluindo o bovino. Para fins práticos no controle de mastite, a recomendação é separar este grande gênero em *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Staphylococcus* coagulase- negativa (SCN) (NMC, 2004).

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, de aproximadamente 1 µm de diâmetro, que tendem a aparecer em aglomerados irregulares semelhantes a cachos de uvas. A maioria das espécies do gênero *Staphylococcus* são anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos.

Com base no teste da coagulase, o gênero *Staphylococcus* divide-se em coagulase negativa e coagulase positiva. *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* são coagulase positiva; a produção de coagulase em *S. hyicus* é variável, mas geralmente apresenta-se fraca ou negativa. (GYLES et al., 2010).

O gênero *Staphylococcus* apresenta excelente crescimento em ágar sangue ovino, meio de cultura largamente utilizado na rotina de diagnóstico bacteriológico. Nesse meio, as colônias são geralmente brancas, opacas e com mais de 4 mm de diâmetro; já as colônias de cepas de *S. aureus* bovino e humano podem apresentar a coloração amarelo dourado. São reconhecidas neste gênero quatro diferentes tipos de hemólises: alfa, beta, gama e delta; sendo que, estas se diferem antigenicamente, bioquimicamente e de acordo com seus efeitos sobre as hemácias de

diferentes espécies. Cepas variam em relação à sua habilidade em produzir hemolisinas, e as cepas de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* isoladas de animais geralmente produzem alfa e beta hemolisinas (QUINN, 2011).

Staphylococcus aureus é considerado a espécie mais importante, pelo fato de estar relacionado com uma série de infecções e intoxicações, tanto no homem quanto nos animais. São encontrados neste microrganismo vários fatores de virulência, os quais são responsáveis pelos sinais clínicos e severidade das infecções causadas, incluindo as hemolisinas α , β , γ , δ , a leucocidina e um grupo de superantígenos tóxicos e pirogênicos (BANNERMAN, 2003).

2.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus destaca-se como o principal micro-organismo causador de mastite contagiosa no mundo inteiro, exercendo importante papel na cadeia produtiva do leite, por gerar perdas econômicas significativas e, por apresentar resistência frente a várias classes de antimicrobianos. Devido à sua alta prevalência no gado leiteiro, a probabilidade de contaminação do leite cru com a bactéria e posterior produção de enterotoxinas é bastante elevada, gerando riscos à saúde humana, visto que essas toxinas podem permanecer estáveis nos derivados lácteos (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

A principal via de infecção na mastite estafilocócica é através da colonização do teto, especialmente quando este apresenta lesões (GYLES et al., 2010). A transmissão ocorre, geralmente, pelas mãos do ordenhador e pelo emprego de panos ou esponjas de uso compartilhado durante a ordenha; ou seja, trata-se de um agente causador de mastite infecciosa. Uma vez estabelecida a infecção, a bactéria desencadeia uma série de mecanismos patogênicos, inclusive a produção de várias toxinas, que podem acarretar necrose e perda de função secretora, levando à queda da produção de leite (SANTOS; FONSECA, 2007).

Staphylococcus aureus é capaz de se ligar à matriz extracelular, utilizando as proteínas - que estão expostas por microlesões ou presentes em coágulos sanguíneos - como substrato para adesão na colonização. O leite é um adequado meio de multiplicação para essa bactéria. Durante a multiplicação, substâncias citotóxicas são produzidas, o que leva à infiltração de neutrófilos na glândula mamária. Essa agregação de neutrófilos resulta em grumos no leite e edema interalveolar. O acúmulo de fibroblastos, macrófagos e linfócitos resulta na expansão do tecido interalveolar. A bactéria permanece nos alvéolos e ductos onde são excretadas de forma intermitente. A intensa multiplicação de *S. aureus* pode resultar em granulomas ou abscessos (GYLES et al., 2010).

As infecções causadas por este micro-organismo geralmente são de caráter subclínico, podendo apresentar períodos com sintomatologia clínica, caracterizados por edema moderado e coágulos evidentes no teste da caneca. Em casos de cronicidade, é extremamente difícil a cura pela antibioticoterapia, em razão do desenvolvimento de tecido fibroso em muitos locais. As áreas fibrosadas impedem a perfusão do antimicrobiano e permitem a continuidade da infecção.

Um obstáculo importante ao controle da infecção por *S. aureus* é a resistência antimicrobiana. *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) ocasionam importantes quadros de infecção em humanos, sendo uma grande preocupação na principalmente quando envolvidos em infecções hospitalares. Além da resistência a todos os beta-lactâmicos, associada à presença do gene *mecA*, os MRSA geralmente apresentam outros genes de resistência a antimicrobianos carregados na mesma região do genoma, sendo portanto multirresistentes. O gene *mecA* codifica uma proteína ligadora de penicilina (PBP) alterada (PBP2a ou PBP2'), que apresenta baixa afinidade a todos os beta-lactâmicos, levando à resistência frente a todos os antimicrobianos que se ligam a essa proteína para exercer sua atividade (WEESE, 2010).

Dessa maneira, as cepas de MRSA geralmente apresentam resistência frente a diferentes classes de antimicrobianos comumente utilizados no tratamento das enfermidades estafilocócicas. O leite contaminado com MRSA pode ser uma fonte de infecção para o humano, portanto a sua investigação é essencial para avaliar sua importância, inclusive como agente zoonótico (GYLES et al., 2010).

2.2.1.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Ainda que *S. aureus* seja a espécie de maior importância em mastite dentro do grupo dos *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), muitas vezes a correta identificação da espécie não é feita pelos laboratórios, tratando dessa forma, todos os SCP como *S. aureus* (COSTA, 2009). Para chegar ao diagnóstico por meio de testes fenotípicos é possível utilizar: a detecção de hemólise em Ágar sangue ovino, fermentação de trealose, manitol e maltose, assim como a produção de acetoína (VP) (HOLT et al., 1994). Porém, os testes fenotípicos não são capazes de separar de forma definitiva *S. aureus* das demais espécies de SCP (*S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*), sendo necessária a realização de testes genotípicos. Desses, o mais utilizado é a amplificação do gene da proteína A (*pta*) seguido da clivagem do produto amplificado com a enzima de restrição MboI (BANNOEHR et al., 2009). Pelo padrão de clivagem obtido, é possível diferenciar as espécies.

No que se refere à mastite *S. intermedius* é a segunda espécie de SCP mais importante, juntamente com a espécie coagulase-variável (*S. hyicus*), ressaltando a importância do diagnóstico diferencial (COSTA, 2009).

2.2.1.3 *Staphylococcus* coagulase negativa

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) estão presentes na microbiota normal da pele e são considerados de caráter oportunista, infectando o canal do teto e glândula mamária através de portas de entrada na pele. As colônias de SCN podem apresentar de 3 a 8 mm em 48 horas, com coloração branca, creme, acinzentada ou amarelo-ouro; a hemólise pode estar ausente ou apresentar-se como um halo estreito (NMC, 2004).

A infecção ocorre, geralmente, de forma subclínica ou clínica discreta; no entanto há relatos de mastite com sinais clínicos graves, assim como sintomas sistêmicos. A infecção por SCN também tem sido relacionada com o aumento da CCS (JARP, 1991). Mais de 10 espécies diferentes de SCN já foram isoladas de amostras de leite bovino, sendo as mais frequentes: *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus simulans* (TRINIDAD et al., 1990; MATTHEWS et al., 1992). Rotineiramente, a identificação não é feita até espécie, uma vez que a simples adoção de testes fenotípicos não permite a diferenciação. Assim, usualmente são referidos apenas como *Staphylococcus* coagulase negativa (PYÖRÄLA, 2009).

2.2.2 Gênero *Streptococcus* e *Enterococcus*

Streptococcus (*Strep.*) são cocos Gram-positivos (1µm de diâmetro), que se apresentam em arranjo de cadeias de diferentes comprimentos. Apresentam colônias translúcidas, geralmente com hemólise no ágar sangue. Esses microrganismos são catalase negativa, anaeróbios facultativos e também possuem comportamento fastidioso, necessitando de meio enriquecido com sangue ou soro (QUINN, 2011).

As espécies de estreptococos são importantes causadoras de mastite (MINST et al., 2012). As mais comumente envolvidas na infecção intramamária são *Strep. agalactiae*, *Strep. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* e *Strep. uberis*. Em menor frequência, outras espécies como *Strep. equinus* (anteriormente *Strep. bovis*), *Strep. Acidominus* e *Strep. parauberis* também podem ser isoladas (NMC, 2004).

Enterococcus sp. são micro-organismos oportunistas, cujo principal habitat são o trato gastrointestinal de animais e seres humanos. Pode ser diferenciado fenotipicamente dos estreptococos a partir de alguns aspectos relevantes: são tolerantes a sais biliares, crescem em Ágar MacConkey como colônias pequenas avermelhadas e algumas cepas são móveis

(QUINN, 2011). As espécies mais comumente envolvidas em mastite são *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* e *Enterococcus sacharolyticus* (NMC, 2004).

Para a identificação e diferenciação de estreptococos e enterococos alguns testes podem ser feitos, como: CAMP (*Christie, Atkins, Münch- Peterson test*), crescimento em meio contendo 6,5% de Cloreto de Sódio, Bile-esculina, hidrólise de esculina e tipificação dos antígenos polissacarídeos de parede pelo teste de Lancefield (NMC, 2004).

2.2.2.1 *Streptococcus agalactiae*

Micro-organismo considerado extremamente contagioso, sua transmissão ocorre durante a ordenha, principalmente por teteiras e mãos do ordenhador (SANTOS; FONSECA, 2007). *Strep. agalactiae* coloniza particularmente os sistemas de ductos da parte inferior do quarto afetado, podendo se disseminar e causar lesões no tecido, levando ao acúmulo de leucócitos e restos teciduais, ocasionando o bloqueio dos ductos. A formação de tecido fibroso, devido ao acúmulo de bactérias e leite, leva à diminuição da produção do mesmo. Se não houver o tratamento adequado e o esgotamento completo do teto durante a ordenha, para que os coágulos sejam eliminados e desobstruam os ductos, a inflamação pode se tornar crônica com episódios clínicos intermitentes e possível perda do quarto afetado (PHILPOT; NICKERSON, 2002). O aumento da CCS (acima de 1.000.000 cel./ml) causa um grande prejuízo na qualidade do leite e isso pode ocorrer quando o agente está em alta prevalência no rebanho (SANTOS; FONSECA, 2007).

Essa bactéria produz um fator que determina a lise completa de hemácias, lesadas pela β – hemolisina produzida pelo *S. aureus*. Essa interação produz a característica “ponta de flecha” no teste de CAMP(Figura 1).

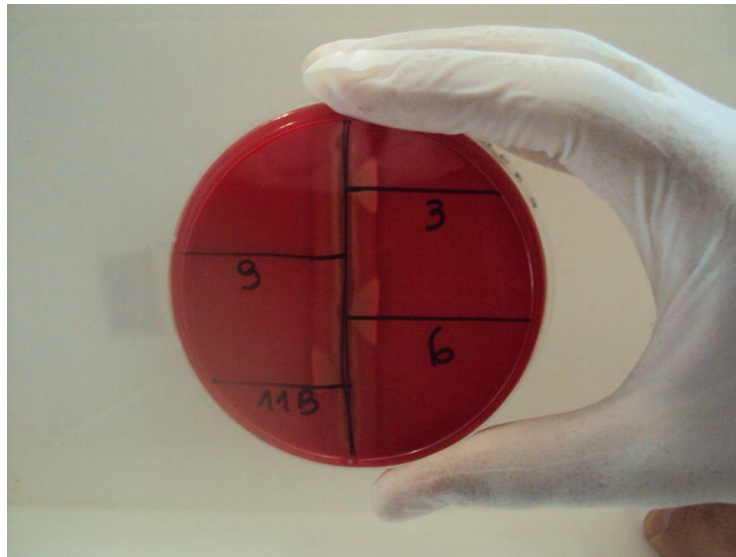


Figura1 - Placa de ágar sangue apresentando o teste de CAMP. *Streptococcus agalactiae* apresenta alteração característica em ponta de flecha.

2.2.2.2 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*

Streptococcus dysgalactiae subsp. *dysgalactiae* é encontrado colonizando a cavidade bucal, mucosa genital e pele da glândula mamária (QUINN, 2011). Pertence ao grupo C de Lancefield, é alfa hemolítico e causa, principalmente, mastite subclínica e aguda (GYLES, 2010). Possui um comportamento distinto dos demais organismos causadores de mastite, pois tem características tanto de patógeno ambiental, quanto de contagioso (NMC, 2004).

2.2.2.3 *Streptococcus uberis*

É considerado um agente ambiental e pode ser encontrado na pele, tonsilas, intestino e mucosas de bovinos. Na Europa, Austrália e América do Norte, *Streptococcus uberis* é responsável por 20 a 30% dos casos de mastite clínica (GYLES, 2010). Sua importância como agente ambiental em mastite clínica e subclínica tem se tornado cada vez mais notável, tanto no período de lactação, quanto no período seco (ODIERNO, 2006).

2.2.2.4 *Streptococcus equinus*

Este microrganismo é isolado em menor frequência em comparação aos outros estreptococos e pode ser classificado como agente do ambiente. *Streptococcus equinus*,

anteriormente chamado de *Streptococcus bovis*, pertence ao grupo D de Lancefield (NMC, 2004).

2.2.3 Coliformes

Neste grupo destacam-se os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, microrganismos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São considerados ambientais, pois são encontrados no solo, água e trato gastrointestinal dos animais. Outras bactérias Gram-negativas também podem ser isoladas em casos de mastite como: *Serratia*, *Pseudomonas*, *ProteusePasteurella* (NMC, 2004).

2.2.3.1 *Escherichia coli* (*E. coli*)

Este microrganismo está presente no trato gastrointestinal dos animais (NMC, 2004) e é considerado o agente mais isolado nos casos de mastite por coliformes, estando envolvido em cerca de 80% dos casos (SUOJALA, 2013). O meio seletivo e diferencial utilizado para o isolamento desta espécie bacteriana é o Ágar MacConkey, onde as colônias apresentam-se planas, de coloração rósea a avermelhada e cercadas por um halo rosa (NMC, 2004). Alguns testes como: reação positiva de indol, reação negativa de urease, não produção de H₂S, e incapacidade de utilizar o citrato como fonte de carbono, auxiliam no diagnóstico desse microrganismo (GYLES, 2010).

A mastite causada por *E. coli* pode ser desde uma infecção subclínica até uma forma clínica com comprometimento sistêmico. Essa bactéria produz endotoxinas, as quais são liberadas após sua lise, causando um rápido aumento das células somáticas. A sintomatologia causada pela endotoxina pode ir desde febre até reposta generalizada, ocasionando a morte do animal. O leite torna-se aquoso com formação de coágulos e a produção do mesmo decai rapidamente (PHILPOT; NICKERSON, 2002).



Figura 2 - Mastite causada por *Escherichia coli*. Alterações visíveis no leite (presença de grumos e aspecto aquoso).

As vacas que estão próximas ao parto ou no início da lactação apresentam com maior frequência sinais clínicos graves, em decorrência da mastite por *E. coli*. Já os animais que estão no final da lactação apresentam sintomas brandos a moderados (PEZESHKI, 2011).

Para controlar a infecção por *E. coli* é primordial que haja uma diminuição da contaminação do úbere. Essa contaminação ocorre quando, após a ordenha, o esfíncter do teto permanece aberto e a vaca, ao deitar-se, entra em contato com as fezes depositadas no piso (GYLES, 2010).

2.2.4 *Serratia* sp.

A infecção causada por este micro-organismo tende a ser longa, em comparação às outras bactérias Gram-negativas, além de estar associada, frequentemente, com o período seco (TODHUNTER, 1991). Em Ágar MacConkey, apresenta colônias translúcidas ou com

pigmentação vermelha. É lactose negativa, utiliza citrato como fonte de carbono e é oxidase negativa (NMC, 2004).

2.2.5 *Corynebacterium* sp.

São bactérias Gram-positivas em forma de bastonetes, aeróbias, de crescimento lento (após 48 horas de incubação). Apresentam colônias opacas, não hemolíticas e com tamanho médio de 1 mm de diâmetro. O meio apropriado para seu isolamento é o ágar sangue e a espécie lipofílica mais frequentemente isolada em mastite é *Corynebacterium bovis*. A morfologia da colônia e da bactéria, a reação positiva de catalase e a ausência de hemólise são alguns testes básicos para identificar *C. bovis* (NMC, 2004).

C. bovis coloniza principalmente o canal do teto e a presença do mesmo tem servido como indicador de higiene na ordenha (WATTS, 2000). Este microrganismo causa mastite subclínica, possui baixa patogenicidade e é considerado, por alguns pesquisadores, como comensal da glândula mamária. Portanto, o isolamento em amostras de leite pode ser acidental, uma vez que, em muitas vacas clinicamente sadias, esse agente também pode ser encontrado. Apesar de não possuir grande importância clínica, é considerado um agente altamente contagioso (SANTOS; FONSECA, 2007) e surtos podem ocorrer em rebanhos onde não é adotada a terapia da vaca seca, nem a desinfecção após a ordenha (pós-*dipping*) (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

2.3 Contagem de Células Somáticas

A contagem de células somáticas (CCS) do leite é um método importante no diagnóstico da mastite subclínica e é aceito mundialmente como parâmetro de monitoramento da sanidade do úbere e determinação da qualidade do leite cru (LANGONI, 2011). As células somáticas do leite são compostas de células originárias do sangue (linfócitos, macrófagos e neutrófilos) e células epiteliais da descamação natural e renovação do epitélio secretor da glândula mamária (SANTOS; FONSECA, 2007). Com o monitoramento da CCS, é possível avaliar o estado inflamatório do úbere, através de amostras de leite dos quartos individuais ou até mesmo de um grupo de animais (PHILPOT; NICKERSON, 2002). Em casos de mastite, o aumento da CCS ocorre devido ao aumento da passagem de leucócitos do sangue para a glândula mamária, juntamente com a descamação excessiva do epitélio danificado (SANTOS; FONSECA, 2007).

A contagem das células somáticas pode ser feita de dois modos diferentes: método direto, através do exame eletrônico em equipamentos como o SOMACOUNT-300

(BentleyR[®]), ou indiretos, pelo *California Mastitis Test* (CMT) (LANGONI, 2011). Com a metodologia eletrônica é possível obter resultados com mais precisão e analisar um grande número de amostras. Para a correta compreensão da contagem de células somáticas é necessário levar em conta alguns fatores importantes, como:

- **Nível de infecção:** É responsável pela grande amplitude na CCS. A contagem é baixa para aqueles animais que não estão infectados, intermediária para aqueles infectados com patógenos de menor importância e alta para as vacas infectadas com patógenos maiores. Portanto, aquelas vacas que apresentarem contagem abaixo de 200.000/ml, possivelmente estão livres de patógenos causadores de mastite.

- **Estágio de Lactação:** É possível constatar que vacas não infectadas no período seco podem apresentar CCS máxima, esse aumento pode ser explicado pelo fato de que com o avanço da lactação a produção de leite diminui, mas a concentração de células somáticas continua inalterada. Já para aquelas que estão no pico de produção até a metade da lactação, a CCS é baixa.

- **Idade da vaca:** para os animais que nunca se infectaram, a CCS, provavelmente, se manterá baixa. Vacas mais velhas apresentam CCS maior devido à exposição prolongada aos agentes da mastite (PHILPOT; NICKERSON, 2002).

É importante ressaltar que o leite com altas contagens de células somáticas apresenta composição alterada, o que leva à redução do tempo de vida de prateleira, gerando prejuízos às indústrias de laticínios. Correlação positiva entre alta CCS e resíduos de antimicrobianos, em torno de cinco vezes maior para rebanhos com CCS acima de 750.000 cel./mL do que aqueles rebanhos que apresentam baixas contagens também já foi relatada, devido aos recorrentes tratamentos com antimicrobianos nos casos de mastite (SANTOS;FONSECA, 2000).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas amostras, em seis propriedades rurais pertencentes a uma cooperativa, localizada na serra gaúcha, escolhidas por conveniência. Quatro propriedades eram localizadas no município de Veranópolis e duas no município de Carlos Barbosa. Todas as propriedades utilizavam ordenha mecânica, boas práticas de higiene e pós-dipping após a ordenha. Apenas três destas propriedades empregavam pré-dipping, sendo que as demais utilizam somente água e papel toalha para proceder a limpeza do teto antes da ordenha. Com relação ao controle da CCS, apenas uma das propriedades realizava o controle mensalmente por amostragem do tanque, enquanto que quatro faziam o controle leiteiro completo, incluindo o número de crias e apenas uma não disponibilizava a ordem de parto. Nenhuma das propriedades amostradas realizava o CMT rotineiramente, somente quando se fazia necessário.

As coletas foram realizadas nos meses de agosto e setembro de 2013, contabilizando uma coleta por mês em cada propriedade. A cada visita, todas as vacas em ordenha na propriedade foram coletadas, não sendo realizados testes para verificar a presença de mastite. As colheitas foram realizadas no momento da ordenha, sendo descartados os primeiros jatos de leite e, logo após cada teto foi higienizado com papel toalha embebido com álcool 70%. Após este procedimento, de dois a três jatos de leite de cada quarto mamário foram colhidos em um mesmo recipiente plástico estéril, constituindo uma amostra composta por animal. Os frascos contendo as amostras foram imediatamente refrigerados para o transporte e congelados para posterior identificação bacteriana no laboratório.

As amostras de leite foram semeadas em ágar-sangue, contendo 5% de sangue ovino. Foi semeado 10 microlitros (uL) de cada amostra com auxílio de alça de plástico estéril calibrada. As placas inoculadas foram incubadas em estufas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 48 horas. Colônias obtidas foram identificadas de acordo com a sua morfologia, presença ou não de hemólise e foi realizada a coloração de Gram. Aquelas amostras de leite que apresentaram três ou mais tipos de colônias foram consideradas contaminadas e não foram computadas. As colônias representativas foram repicadas em Agar triptona de soja (TSA), incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas a fim de se obter culturas puras. Para as bactérias que se apresentaram negativas na coloração de Gram, além do TSA foi utilizado ágar MacConkey. Nos casos em que os microrganismos isolados apresentaram-se como cocos Gram-positivos foram realizados a prova de catalase sendo que, desta maneira, as amostras catalase positivas foram direcionadas para os testes bioquímicos da coagulase e produção de acetoina (teste de Voges– Proskauer -

VP), e aquelas que apresentaram catalase negativas foram submetidas a testes de Bile esculina, BHI com NaCl 6,5% e Esculina (NMC, 2004). As amostras que obtiveram resultados positivos frente à prova de coagulase e produção de acetoina foram classificadas com *Staphylococcus aureus* e, aqueles isolados que se apresentaram positivos para coagulase e negativos para produção da acetoina foram classificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP). Já as bactérias que se apresentaram como Gram negativas, foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: lactose, citrato, motilidade-indol-H₂S(SIM), oxidase e TSI. Amostras identificadas como *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), foram submetidas à técnica de PCR-RFLP do gene *pta* (BANNOEHR et al., 2009). As amostras de DNA foram purificadas utilizando *kit* comercial *NucleoSpin® Tissue* (MacheryNagel, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Para a PCR foram utilizados 1mmol de cada *primer* (*pta_f1*:5' AAAGAC AAA CTT TCA GGT AA3'; *pta_r1*: 5' GCA TAA ACAAGC ATT GTA CCG3'), 200 mmol de dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), tampão (10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, 50mM KCl [pH 8,3]), 1 unidade de Taq polimerase, 3,0 µL da amostra de DNA e água bidestilada para completar o volume total de 50uL. Em todas as reações foram utilizadas amostras de controle negativo (sem DNA) e como controle positivo (*S.aureus* ATCC 6538). Para a realização da RFLP-PCR foi utilizado 25 µL do produto da PCR, 5U da enzima MboI e 5µL de tampão da enzima. As amostras foram incubadas durante 2 horas a 37°C (BANNOEHR et al., 2009). Os produtos da RFLP-PCR foram submetidos à separação em gel de agarose 1,5% e corados com 10mg/mL de solução de *Blue Green®* (LGC). Os controles positivos e negativos foram incluídos no gel, utilizou-se marcador de 100 pares de base (PROMEGA®, Madison, EUA) (pb). O resultado foi documentado em fotodocumentador (Gel Logic 2200 Pro).

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco difusão em ágar, seguindo-se as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os testes foram conduzidos em Ágar Mueller-Hinton(Oxoid®). Utilizaram-se discos (Oxoid®) impregnados com os seguintes antimicrobianos: Tetraciclina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Ceftiofur (30µg), Cefoxitina (30µg), Gentamicina (10µg), Ampicilina (10µg), Enrofloxacina (5µg) e Florfenicol (30µg).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das 201 amostras de leite colhidas na primeira visita, foram isoladas 10% (20/201) de *Corynebacterium bovis*, 6% (13/201) de SCN, 6% (14/201) de estreptococos ambientais, 5% (11/201) de *Staphylococcus aureus*, 4% (8/201) de *Enterococcus* sp., 3% (6/201) de SCP, 4% (8/201) de amostras apresentaram duas bactérias, 48% (97/201) de amostras não apresentaram crescimento após 72 horas. Em relação às amostras contaminadas, estas contabilizaram 12% (24/201) do total de amostras analisadas.

Tabela 1 - Micro-organismos isolados na primeira coleta de amostras de leite realizadas em seis propriedades da Serra do Rio Grande do Sul.

Micro-organismo	Propriedades						Total
	A	B	C	D	E	F	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	2	3	3	1	1	11
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP)	1	1	1	2	1		6
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCN)	5	5	2			1	13
<i>Streptococcus uberis</i>	1	4				1	6
<i>Streptococcus equinus</i>	1	4					5
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1	1	1				3
<i>Enterococcus</i> sp.	1	2	1	1		3	8
<i>Corynebacterium bovis</i>	8	5	4	2	1		20
SCN e <i>Streptococcus uberis</i>		1					1
SCN e <i>Staphylococcus aureus</i>		1					1
SCN e <i>Corynebacterium bovis</i>			1				1
SCP e <i>Enterococcus</i> sp.		1					1
<i>Streptococcus uberis</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>				1			1
<i>Streptococcus uberis</i> e <i>Corynebacterium bovis</i>				1			1
<i>Streptococcus uberis</i> e <i>Streptococcus equinus</i>						1	1
<i>Corynebacterium bovis</i> e <i>Enterococcus</i> sp.				1			1
Negativo	57	6	4	10	14	6	97
Amostras contaminadas	4	9			9	2	24
Total	80	41	17	21	26	15	201

Em relação à segunda coleta, 207 amostras foram analisadas, dentre as quais 10% (20/207) foram SCN, 8% (16/207) *Corynebacterium bovis*, 7% (15/207) estreptococos ambientais, 6% (12/207) *Staphylococcus aureus*, 5% (10/207) *Enterococcus* sp., 46% (96/207) foram amostras sem crescimento em 72 horas e 15% (32/207) estavam

contaminadas. Com menor relevância, foi detectada uma amostra com *Escherichia coli*, uma com *Serratia* sp.e três amostras com duas bactérias isoladas.

Em relação às vacas que foram coletadas em ambas as visitas, 41 animais (29,5%) apresentaram crescimento bacteriano em ambas as coletas, os quais 22 animais (54%), manifestaram o mesmo micro-organismo em ambas coletas. Dentre os agentes estão: estreptococos ambientais (6 animais), *Corynebacterium bovis* (5 animais) e *S. aureus* (4 animais).

Tabela 2 - Agentes isolados na segunda coleta das amostras de leite de Veranópolis e Carlos Barbosa, em seis propriedades distintas.

Micro-organismo	Propriedades						Total
	A	B	C	D	E	F	
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1	3	5		1	12
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (SCP)					1		1
<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa (SCN)	12	4	1	1	1	1	20
<i>Streptococcus uberis</i>	1	4		2			7
<i>Streptococcus equinus</i>		6	1				7
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>		1					1
<i>Enterococcus</i> sp.	6		2	1		1	10
<i>Corynebacterium bovis</i>	3	2	4	5	1	1	16
<i>Escherichia coli</i>	1						1
SCN e <i>Corynebacterium bovis</i>				1			1
<i>Streptococcus uberis</i> e <i>Corynebacterium bovis</i>				1			1
<i>Streptococcus equinus</i> e <i>Enterococcus</i> sp.						1	1
<i>Serratia</i> sp.	1						1
Negativo	40	18	7	3	22	6	96
Amostras contaminadas	23	4			3	2	32
Total	89	41	18	19	28	13	207

Nove isolados de SCP foram submetidos ao PCR-RFLP, sendo um identificado como *Staphylococcus aureus*. Portanto, observa-se que os testes fenotípicos (produção de acetoina e coagulase) podem falhar na identificação definitiva da espécie, concordando com o previamente relatado por BRITTO et al. (2002). As demais amostras não apresentaram resultados conclusivos na identificação.

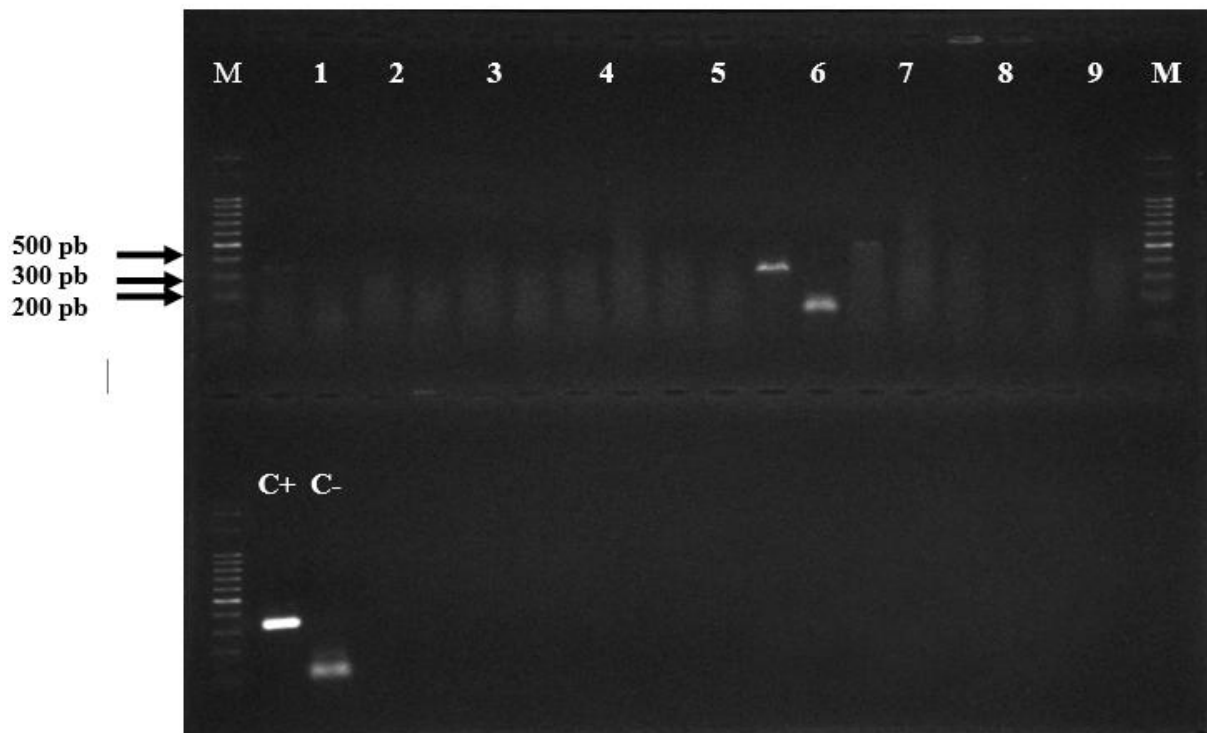


Figura 3–Produtos da RFLP-PCR em gel de agarose 1,5%. Controles positivo e negativo estão apontados na figura; marcador de 100 pares de base (pb). A amostra 6 apresenta a amplificação do gene *pta* (320 pb) e a clivagem com enzima *mbo1*, resultando em fragmentos de restrição em 156 pb e 164 pb, formando uma única banda aparente, devido à proximidade dos locais de clivagem. As demais amostras não apresentaram resultados conclusivos na identificação.

As principais bactérias isoladas foram *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), assim como Tenhagen (2006), onde relatou que os “patógenos menores” foram os agentes mais isolados em seu estudo. Em outro estudo, feito por Santos (2009), a bactéria mais isolada foi *Corynebacterium* sp., onde juntamente com *Streptococcus* sp. (não *Strep.agalactiae*) e *Staphylococcus* coagulase negativo foram encontrados em todos os rebanhos analisados. Ao contrário, Oliveira et al. (2011) encontraram *Corynebacterium* sp. como agente menos isolado na bacia leiteira de Rondon (Pará), tanto nos casos de mastite clínica, quanto nos casos de mastite subclínica.

Makovec e Ruegg(2003) observaram um aumento no isolamento de SCN de 12.7% para 17.5% nas amostras analisadas durante o período de 1994 a 2001. Em muitos países SCN tem se tornado o maior agente causador de mastite e, por isso, deve ser considerado como um possível entrave na produção leiteira (PITKALA et al., 2004). No estudo de CRUZ et al.(2011) conduzido no rebanho leiteiro no sul do Brasil, a bactéria mais isolada nas 767

amostras de leite foi SCN. Outro estudo feito na Alemanha por Krömker et al.(2011) também obteve como agente predominante *Staphylococcus* coagulase negativa. O aumento da contagem das células somáticas pode ser uma das consequências dessa infecção, resultando em perdas econômicas e na qualidade do leite (PYORALA; TAPONEN, 2009). No presente estudo, porém, não pode ser feita a associação dos isolamentos com casos de mastite, uma vez que o aumento de CCS não foi monitorado.

A respeito de agentes contagiosos, Makovec e Ruegg (2003) descreveram que o diagnóstico de *Streptococcus agalactiae* vem declinando. Assim pode se compreender o fato desse agente não ter sido isolado em nenhuma das 408 amostras analisadas no presente estudo.

Nesta pesquisa, *Staphylococcus aureus* foi o microrganismo mais isolado entre os principais patógenos causadores de mastite contagiosa, o mesmo foi observado por Cruz e colaboradores (2011) e Tenhagen (2006). No entanto Makovec e Ruegg (2003) observaram um decréscimo no aparecimento de *S. aureus*, e isso pode ser explicado pela eficiência nas medidas de controle para mastite contagiosa nas propriedades amostradas nesse estudo.

No que se refere aos agentes ambientais, destacam-se os estreptococos ambientais (*Strep. uberis*, *Strep. dysgalactiae* e *Strep. equinus*), os quais foram encontrados em maior frequência no presente estudo. Os estreptococos ambientais têm se tornado cada vez mais importantes, devido ao aumento das infecções subclínicas (TENHAGEN, 2006). *Strep. uberis* e *Strep. equinus* foram encontrados na mesma proporção em ambas as coletas, já *Streptococcus dysgalactiae* foi isolado em menor frequência.

Neste estudo foram isoladas, somente duas bactérias Gram negativas: *Serratia* sp. e *Escherichia coli*, confirmando a baixa frequência desses agentes na glândula mamária.

Tabela 3 - Resistência à antimicrobianos apresentada por bactérias isoladas da glândula mamária de vacas em lactação de seis propriedades da Serra gaúcha.

Micro-organismo	Antimicrobianos															
	Tetraciclina		Ciprofloxacina		Ceftiofur		Cefoxitina		Gentamicina		Ampicilina		Enrofloxacina		Florfenicol	
	1 ^a *	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	2 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	2/13	1/12									3/13	3/12				
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	2/7										4/7	1/1				
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	6/16										6/16	4/21				
<i>Streptococcus uberis</i>	1/4								2/4	1/3						
<i>Streptococcus equinus</i>		1/3		3/3				3/3						1/3		1/3
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	1/3	1/1		1/1				1/1	2/3	1/1						

* 1^a: primeira coleta; 2^a: segunda coleta

Estão listados, na tabela 3, os micro-organismos resistentes aos antimicrobianos testados. Em relação aos estreptococos ambientais (*Strep. uberis* e *Strep. equinus*), o antibiograma foi realizado somente com algumas amostras, as quais foram sorteadas entre as seis propriedades analisadas. Já para os estafilococos e *Strep. dysgalactiae*, procedeu-se como antibiograma para todos os isolados.

Os antimicrobianos que apresentaram menor susceptibilidade frente aos estafilococos isolados na primeira coleta foram a tetraciclina e a ampicilina. Com relação aos estreptococos ambientais, foi observado que, no mínimo, 50% dos isolados foram resistentes a gentamicina.

Em relação à segunda coleta, nenhum micro-organismo apresentou resistência frente ao Ceftiofur. Assim como na primeira coleta, estafilococos apresentaram resistência à ampicilina (mínimo 19% das amostras com resistência). Os resultados encontrados para *Streptococcus dysgalactiae* foram de 100% de resistência à tetraciclina, ciprofloxacina, cefoxitina e gentamicina. Os isolados de *Streptococcus uberis* da segunda coleta não se mostraram resistentes à tetraciclina, já *Streptococcus equinus* e *Streptococcus dysgalactiae* obtiveram 33% e 100% de amostras resistentes, respectivamente.

As bactérias Gram negativas isoladas, *Escherichia coli* e *Serratia* sp., também apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos testados. A respeito do primeiro agente, evidenciou-se resistência ao florfenicol e para o segundo microrganismo, à tetraciclina, cefoxitina e florfenicol. É importante ressaltar que a utilização via sistêmica de antimicrobianos no tratamento de mastites severas causadas por coliformes é indicado, devido ao alto risco de bacteremia (SUOJALA, 2010).

Em comparação com os dados obtidos neste trabalho, a resistência à tetraciclina entre os estreptococos ambientais foi observada em pelo menos uma das espécies isoladas, da mesma forma em que Minst et al. (2012), constatou em seu estudo na Alemanha, onde a resistência à tetraciclina nas 279 amostras de estreptococos analisadas foi observada em maior frequência. Resultados diferentes foram constatados por Giannechini e colaboradores (2002), onde apenas 7% dos *Streptococcus uberis* apresentaram resistência frente aos antimicrobianos testados em seu estudo, e não foi observada resistência frente à tetraciclina ou eritromicina nos isolados de *Streptococcus uberis*.

Minst (2012) observou níveis baixos de resistência à gentamicina em estreptococos isolados em seu estudo; já no presente estudo 100% dos isolados de *Streptococcus dysgalactiae* apresentaram resistência frente a este antimicrobiano. Em outro estudo de

Schroder e colaboradores (2005) também observaram resistência em 93% dos isolados de estreptococos frente à gentamicina.

A ampicilina demonstrou ser eficiente frente aos estreptococos, visto que não houve resistência em nenhuma das amostras isoladas no presente estudo. Resultado similar ao encontrado por Minst et al (2012) que concluiu que os β -lactâmicos como a penicilina e a ampicilina devem ser as drogas de primeira escolha para o tratamento de mastites causadas por estes microrganismos.

Em relação às amostras de *S. aureus*, estas não apresentaram resistência à enrofloxacina, diferentemente do estudo feito por Langoni e colaboradores (2000), onde foi encontrado 5% das amostras resistentes a esse antimicrobiano. Essa distinção reforça a importância de monitoramentos regionais quanto à sensibilidade microbiana, a fim de auxiliar na escolha do tratamento. *Staphylococcus* resistentes à meticilina (MRSA) são cepas resistentes a todos os β -lactâmicos. Existem evidências de que *S. aureus* possa ter adquirido o gene *MecA* a partir de cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa (LEONARD; MARKEY, 2008). Nesta pesquisa, utilizou-se a Cefoxitina, como método fenotípico, para a investigação de possíveis cepas MRSA. Entretanto, todas as amostras foram sensíveis a este antimicrobiano, indicando que não havia cepas MRSA entre os isolados.

Muitos progressos têm sido feitos nos últimos anos para a melhoria da qualidade do leite, entretanto a prevenção e controle da mastite ainda são entraves constantes na produção. A atividade leiteira é de extrema relevância para a economia brasileira, tanto no cenário interno como no externo e o crescimento da produção também precisa crescer juntamente com a qualidade do leite.

Muitas vezes, o produtor não tem acesso à informação ou não possui treinamento adequado para a aplicação de boas práticas de produção. Quando a saúde do úbere é afetada ocorrem alterações significativas na qualidade do leite, a produção reduz, tendo como consequências para o produtor grandes prejuízos e também ao consumidor por não receber um produto de qualidade. O controle da mastite é uma tarefa na qual requer planejamento e cooperação de todos os envolvidos no manejo dos animais.

5 CONCLUSÃO

Os microrganismos mais encontrados na glândula mamária de vacas em lactação de propriedades da serra gaúcha foram *Corynebacterium bovis* e *Staphylococcus coagulase negativa*. O elevado índice de *Corynebacterium bovis* indica deficiência na higiene, pois esse microrganismo coloniza o canal do teto e pode ser eliminado por medidas de higiene. Entre os causadores de mastite contagiosa, apenas *S. aureus* foi encontrado. A maioria das cepas de *S. aureus* foi suscetível a todos os antimicrobianos testados, enquanto SCN apresentaram elevada frequência de resistentes à ampicilina. Estreptococos ambientais apresentaram baixa suscetibilidade aos antimicrobianos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BANNOEHR, J. et al. Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **J ClinMicrobiol**, v. 47, n. 2, p. 469-71, Feb 2009.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J ClinPathol**, v. 45, n. 4, p. 493-6, Apr 1966.
- BENEDETTE, M. F. et al. Mastite Bovina. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, p. 1-5, jul. 2008.
- BRITO, M. A. V. P.; CAMPOS, G. M. D. M.; BRITO, J. R. F. Esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 79-82, 2002.
- COSTA, G. M. et al. Evaluation of a simplified key for the identification of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 32, n. 4, p. 403-406, 2010.
- CRUZ, C. E. F. et al. Records of performance and sanitary status from a dairy cattle herd in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 2011.
- DE VliegHER, S.; ZADOKS, R. N.; BARKEMA, H. W. Heifer and CNS mastitis. **Vet Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 1-2, Feb 2009.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1315-1320, 2004.
- GIANNECHINI, R. E.; CONCHA, C.; FRANKLIN, A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. **Acta Vet Scand**, v. 43, n. 1, p. 31-41, 2002.
- GYLES, C. L. et al. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. . 4. Iowa: Wiley-blackwell, 2010. 651.
- HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **J Dairy Sci**, v. 77, n. 7, p. 2103-12, Jul 1994.
- HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins 1994.
- HUIJPS, K. et al. Cost estimation of heifer mastitis in early lactation by stochastic modelling. **VetMicrobiol**, v. 134, n. 1-2, p. 121-7, Feb 2009.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424.
- JARP, J. Classification of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine clinical and subclinical mastitis. **VetMicrobiol**, v. 27, n. 2, p. 151-8, Apr 1991.
- LANGONI, H.; AL., E. Utilização da enrofloxacin (baytril) no tratamento da mastite bovina estafilocócica. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, p. 167-170, 2000.

LANGONI, H. E. A. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 12, p. 1059-1065, dez. 2011.

LEONARD, F. C.; MARKEY, B. K. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. **Vet J**, v. 175, n. 1, p. 27-36, Jan 2008.

MAKOVEC, J. A.; RUEGG, P. L. Results of milk samples submitted for microbiological examination in Wisconsin from 1994 to 2001. **J Dairy Sci**, v. 86, n. 11, p. 3466-72, Nov 2003. MATTHEWS, K. R.; HARMON, R. J.; LANGLOIS, B. E. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. **J Dairy Sci**, v. 75, n. 7, p. 1835-9, Jul 1992.

MINST, K. et al. Short communication: *Streptococcus* species isolated from mastitis milk samples in Germany and their resistance to antimicrobial agents. **J Dairy Sci**, v. 95, n. 12, p. 6957-62, Dec 2012.

ODIERNO, L. et al. Conventional identification of *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis in Argentinean dairy herds. **J Dairy Sci**, v. 89, n. 10, p. 3886-90, Oct 2006. ISSN 1525-3198. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16960064> >.

PETERSSON-WOLFE, C. S.; WOLF, S. L.; HOGAN, J. S. Experimental challenge of bovine mammary glands with *Enterococcus faecium* during early and late lactation. **J Dairy Sci**, v. 92, n. 7, p. 3158-64, Jul 2009.

PITKÄLÄ, A. et al. Bovine mastitis in Finland 2001--prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 8, p. 2433-41, Aug 2004.

PYÖRÄLÄ, S.; TAPONEN, S. Coagulase-negative staphylococci-emerging mastitis pathogens. **Vet Microbiol**, v. 134, n. 1-2, p. 3-8, Feb 2009.

RADOSTITS, O. M. Diseases of the mammary gland. . In: RADOSTITS, O. M. e AL., E. (Ed.). **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**.10. Sant Louis: Mosby/Elsevier, 2007. cap. 15, p.728-749.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite**.1. Barueri: Manole, 2007. 314.

SCHRÖDER, A.; HOEDEMAKER, M.; KLEIN, G. Resistance of mastitis pathogens in northern Germany]. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 118, n. 9-10, p. 393-8, 2005 Sep-Oct 2005.

SUOJALA, L. et al. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. **J Dairy Sci**, v. 93, n. 5, p. 1960-9, May 2010.

TRINIDAD, P.; NICKERSON, S. C.; ALLEY, T. K. Prevalence of intramammary infection and teat canal colonization in unbred and primigravid dairy heifers. **J Dairy Sci**, v. 73, n. 1, p. 107-14, Jan 1990.

WEESE, J. S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **VetMicrobiol**, v. 140, n. 3-4, p. 418-29, Jan 2010.