

Principais gêneros bacterianos causadores de mastite isolados no Laboratório de Microbiologia Veterinária do Hospital Veterinário do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná/RO

Paulo Henrique Gilio Gasparotto
Franciela Karina Weber
Valeria Aparecida Alves Barbosa
Luciano Batista de Moraes
Bruno Bicalho
Fabiana de Oliveira Solla Sobral

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo identificar os principais gêneros bacterianos causadores de mastite, em estudo de 91 amostras de leite, recebidas pelo Laboratório de Microbiologia da Clínica Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná/RO. A mastite é um processo inflamatório da glândula mamária que acomete principalmente as vacas leiteiras devido a uma má-higienização no momento da ordenha. É dividida em subclínica e clínica, em que a subclínica não apresenta sinais visíveis e, na maioria das vezes, passa despercebida pelos produtores rurais, ao contrário da clínica, que é detectada através de alterações visíveis, sendo ainda subdividida em duas categorias: ambiental e contagiosa. Os resultados detectaram como agentes causadores de mastite os gêneros *Staphylococcus sp.*, com 25,27%; *Streptococcus sp.*, 16,48%; *Escherichia coli* com 9,89%; *Enterobacter sp* com 8,79%; *Proteus sp* com 8,79%; *Pseudomonas sp* com 7,69%, *Corynebacterium sp* com 6,59%; *Klebsiella sp.* com 3,29%; *Citrobactersp* com 1,09%; *Serratia* e *Proteus* com 1,09%, e *Bacilos* com 1,09%.

Palavras-chave: Bovino. Mastite. Agente etiológico. CCS. Diagnóstico.

Main bacterial genetics causers of mastitis isolated in the Veterinary Microbiology Laboratory at the Veterinary Hospital of the Ji-Paraná/RO University Center

ABSTRACT

The present study had as objective to identify the main bacterial genera causing mastitis, in a study of 91 milk samples, received by the Microbiology Laboratory of the Clinical School of

Paulo Henrique Gilio Gasparotto – Médico-Veterinário, EMATER.

Franciela Karina Weber – Acadêmica do curso de Medicina Veterinária – CEULJI-ULBRA.

Valeria Aparecida Alves Barbosa – Acadêmica do curso de Medicina Veterinária – CEUJI-ULBRA.

Luciano Batista de Moraes – Professor do curso de Medicina Veterinária – CEULJI-ULBRA.

Bruno Bicalho – Acadêmico do curso de Medicina Veterinária – CEULJI-ULBRA.

Fabiana de Oliveira Solla Sobral – Professora do curso de Biomedicina – CEULJI-ULBRA.

Veterinary Medicine of the Lutheran University Center of Ji-Paraná/RO. Mastitis is an inflammatory process of the mammary gland, which mainly affects dairy cows due to poor hygiene at the time of milking. It is divided into subclinical and clinical, where the subclinical shows no visible signs and most often goes unnoticed by rural producers, unlike the clinic that is detected through visible changes, being further subdivided into two categories: environmental and contagious. The results showed that the genera *Staphylococcus sp.*, with 25.27%; *Streptococcus sp.*, 16.48%; *Escherichia coli* with 9.89%; *Enterobacter sp* with 8.79%; *Proteus sp* with 8.79%; *Pseudomonas sp* with 7.69%, *Corynebacterium sp* with 6.59%; *Klebsiella sp.*, with 3.29%; *Citrobacter sp* with 1.09%;, *Serratia* and *Proteus* with 1.09%, and *Bacillus* with 1.09%.

Keywords: Bovine. Mastitis. Etiologic agent. CCS. Diagnostics.

INTRODUÇÃO

A mastite é uma doença que acomete os animais e ocasiona a inflamação, normalmente infecciosa, das glândulas mamárias. Alguns microrganismos apresentam maior relevância. A mastite pode ser classificada em clínica e subclínica.

Mastite clínica só é diagnosticada devido às patologias visíveis. Entre as principais, podem-se destacar aparecimento de edema, aumento na temperatura, aparecimento de grumos, exsudato purulento, e mudança na característica do leite (BENEDETTE et al., 2008).

A mastite subclínica, ao contrário da clínica, não apresenta sinais clínicos evidentes, o que, na maioria das vezes, não é notado pelos produtores. Quando não diagnosticada, pode se cronicar no animal infectado, levando à perda da funcionalidade da glândula mamária e, conseqüentemente, reduzindo a produção leiteira e comprometendo a saúde do animal.

A mastite, em algumas situações, pode apresentar-se de forma aguda, com sintomas sistêmicos tais como: depressão, desidratação, diminuição da ingestão de alimentos, baixa produtividade de leite e, em casos mais graves, até a morte do animal (ZENI, 2012).

A mastite, no seu desenvolvimento, caracteriza-se por estágios. O desenvolvimento da mastite pode ser caracterizado em três estágios: invasão, infecção e inflamação, sendo a invasão o estágio em que os patógenos passam do meio externo para as secreções ou leite presente no canal lactífero (RADOSTITS, 2002).

Já a infecção é o estágio em que o microrganismo se fixa no tecido mamário e inicia sua reprodução e proliferação por todo parênquima mamário (PRESTES, 2002).

No terceiro e último estágio, a inflamação é onde se observam as alterações anormais nas glândulas mamárias e vários efeitos sistêmicos no animal (RADOSTITS, 2002).

O manejo correto e a higienização dos tetos, ordenadores e equipamentos antes da ordenha contribuem para a redução da quantidade de micro-organismos na pele dos tetos e, conseqüentemente, do número de infecções causadas por esses patógenos (COSER, 2012).

Dentre os principais agentes etiológicos da mastite, estão: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus sp*; *Pseudomonas sp*; *Escherichia coli*; *Corynebacterium sp*; *Enterobacter*; *Proteus*; *Citrobacter*; *Klebsiella*; *Serratia*; bacilos e algas do gênero *Prototheca*, entre muitas espécies de leveduras. Muitos micro-organismos, dentre eles *Staphylococcus aureus* e algas do gênero *Prototheca* são responsáveis por causar mastite clínica de difícil tratamento (RADOSTITS, 2002).

Staphylococcus aureus (S. aureus)

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos associados à mastite contagiosa bovina. A prevalência de *S. aureus* como causador de mastite bovina, pode estar relacionada aos mecanismos de resistência, tais como a presença do biofilme nos equipamentos de ordenha, redução da susceptibilidade a antimicrobianos, ao baixo percentual de cura durante a lactação e a presença deles tanto no ambiente (fômites) quanto nos animais e no homem (MELO, 2008).

O microrganismo entra na glândula mamária via canal do teto, multiplica-se dentro da cisterna, onde ocorre adesão às células epiteliais, o que representa importante passo no processo de infecção (PICCININI, 2012).

Streptococcus agalactiae

Bactéria altamente contagiosa e adaptada à glândula mamária de bovino. Geralmente, ela não sobrevive por longos períodos fora da glândula, e a principal via de contaminação se dá por contato direto ou fômites contaminados (KEEFE, 2012).

Apresenta crescimento lento na glândula mamária e, com isso, o sistema imune da vaca tem uma forte resposta, resultando na elevação e permanência de uma alta contagem de célula somática (MARONEY; RUEGG, 2004).

A transmissão ocorre principalmente em ordenha, entretanto, bezerras criadas em bezerreiro coletivo e que recebem leite de vacas com mastite também podem adquirir a infecção (SANTOS; FONSECA, 2007).

Dentre outras enfermidades causadas por esse patógeno estão a pneumonia, septicemia e a meningite em neonatos com altas taxas de mortalidade (NAKIB, 2011).

Mycoplasma spp

É um patógeno altamente contagioso em bovinos, podendo causar pneumonias, artrite, otite e, menos frequentemente, abortos e meningites, além de mastites (NICHOLAS; AYLING, 2003).

Na maioria dos casos, a disseminação do agente no organismo é via descendente, afetando primeiramente pulmão ou outros órgãos e, posteriormente, via sanguínea alcança a glândula mamária (FOX et al., 2005).

Devido a esse gênero bacteriano não possuir parede celular rígida, apresentam uma maior susceptibilidade à dessecação, calor, detergentes e aos desinfetantes (QUINN, 2005).

A principal forma de transmissão de infecções intramamária causadas por micoplasmas é através das mãos de ordenhadores, equipamentos de ordenha e o uso de cânulas de uso múltiplo para tratamento. Além disso, são encontradas vacas portadoras do agente que, de maneira intermitente, eliminam micoplasmas pelo leite, consideradas, portanto, como fontes de infecção (SANTOS, 2003). Tal fato pode levar a sérios problemas no rebanho se o nível de infecção não for controlado (PRETTO, 2001).

Corynebacterium bovis

É relativamente comum, estando associado a mastites com aumentos moderados das contagem de células somática (CCS) (RADOSTITS, 2007). Coloniza principalmente o canal do teto, e a presença do mesmo tem servido como indicador de má-higiene na ordenha (WATTS, 2000). Este microrganismo causa mastite subclínica e possui baixa patogenicidade, sendo considerado, por alguns pesquisadores, como comensal das glândulas mamárias. Portanto, o isolamento em amostra 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 (SANTO; FONSECA, 2007), e surtos podem ocorrer em rebanho onde não é adotada a terapia de vaca seca, nem a desinfecção após ordenha (PHILPOT; NECKERSON, 2002).

Streptococcus dysgalactiae

Bactérias do gênero *Streptococcus* são responsáveis por lesões nos tetos, mastite subclínica e clínica, tanto durante a lactação quanto no período seco. As linhagens do *S. dysgalactiae* não sobrevivem ao calor a 60°C por 30 minutos. Lesões nas extremidades dos quartos mamários, como também procedimentos inadequados de ordenha promovem a disseminação da bactéria dentro do rebanho. Contudo, o *Streptococcus dysgalactiae* pode ser encontrado fora da glândula mamária como no ambiente, tonsilas, boca e vagina das vacas e causa mastite aguda (GOMES, 2013).

Pseudomonas Spp

Bactérias do gênero *Pseudomonas Spp* possuem necessidades nutricionais mínimas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes. Estão associadas a águas contaminadas que são utilizadas na preparação e limpeza dos úberes antes da ordenha, e na higiene das camas (RADOSTITS et al., 2007).

Staphylococcus coagulase negativo (SCN)

São patógenos comuns em rebanhos leiteiros, sendo mais frequentes em animais de primeira lactação, e estão principalmente associados aos casos subclínicos de mastite, a presença de células somáticas no leite, com contagem de célula somática próxima a 300.000 a 400.000 cels/mL de leite. Os *Staphylococcus coagulase negativos* constituem um grupo bastante heterogêneo de microrganismos associados a infecções da glândula mamária de bovinos, sendo comumente encontrados no ambiente dos estabelecimentos de ordenha, em equipamentos, de ordenha e na pele dos quartos mamários (SANTOS, 2011).

Escherichia coli

As infecções por essa bactéria são caracterizadas exclusivamente por sintomas agudos seguidos de cura espontânea. No entanto, dentre os casos em que a mastite resultou em morte, os mais prevalentes são causados pela *Escherichia coli* (RINALDI, 2010).

Quanto mais rápido o número de bactérias for elevada na glândula mamária, maior quantidade de LPS estará presente na glândula, e a resposta inflamatória à doença clínica ocorrerá mais rapidamente (MEHZRA, 2008).

A *E. coli* habita o trato gastrointestinal das vacas leiteiras, é classificada como patógeno ambiental da mastite, pois sua infecção é primariamente dependente da exposição ao ambiente (QUINN, 2005).

Este agente patológico produz toxinas durante sua multiplicação que quando liberadas, são absorvidas e caem na corrente sanguínea, e em questão de horas as vacas apresentam sinais clínicos, sendo que a gravidade do caso dependerá da resposta imune do animal (SANTOS; FONSECA, 2007).

Streptococcus uberis

É um agente comum de mastite clínica e subclínica, geralmente de natureza ambiental. Contudo, também pode apresentar-se de forma contagiosa, disseminada entre os animais ou mesmo pelos ordenadores e equipamentos (ZADOKS et al., 2002).

Os locais que servem como reservatórios naturais do *S. uberis* são representados pelo trato gastrointestinal, pele, solo e material de cama. As moléculas bacterianas secretadas pelo *S. uberis* acarretam falhas na produção de pseudópodes, inibindo assim a fagocitose dos neutrófilos, o que permite maior permanência das bactérias na glândula mamária (SCHUKKEN, 2011).

Klebsiella pneumoniae

É um agente ambiental comum de mastite clínica e subclínica em rebanhos bovinos leiteiros e pode ser encontrado principalmente no produto final da ordenha, o leite. A mastite causada por esse agente patológico é considerada de intensa gravidade, devido à resistência do patógeno a antibióticos e uma rápida evolução para choque tóxico e morte do animal (LANGONI et al., 2015).

Prototheca Spp.

São algas unicelulares, sem clorofila, de distribuição universal, que se fixam no interior das células. Em vacas leiteiras, podem provocar mastite clínica ou, mais frequentemente, subclínica, com as implicações produtivas consequentes a este tipo de mastite (BEXIGA et al., 2003), as algas do gênero *Prototheca* estão amplamente distribuídas em ambientes com alta umidade (solo, lama, esgoto, fezes), a partir desses locais o microrganismo contamina alimentos, água e fômites (GREENE, 2006; LASS-FLÖRL; MAYR, 2007).

Os microrganismos são frequentemente isolados do leite de vacas, secreções de vacas secas, ordenhadeiras, cama dos animais e alimentos de propriedades rurais de exploração leiteira, nas quais, a alga pode manter-se viável por semanas até meses no ambiente. Os microrganismos podem ser isolados das fezes de suínos, porém, com menor frequência (RANJAN, 2006).

DIAGNÓSTICO DA MASTITE

Normalmente, a forma clínica da mastite é detectada por meio de observações realizadas pelos próprios ordenhadores sobre as condições anormais do leite e/ou úberes das vacas. A mastite subclínica pode ser diagnosticada através da análise microbiológica do leite e de forma indireta através do *California Mastitis Test (CMT)*, *Winsconsin Mastitis Test (WMT)* e a *Contagem de Células Somáticas (CCS)* (SILVA, 2008).

A mastite clínica é mais fácil de ser diagnosticada, devido a presença dos seguintes sinais clínicos compatíveis com a reação inflamatória (dor, calor, rubor e edema). O úbere apresenta-se inflamado, difuso ou focalmente; dolorido em um ou mais quartos, resistência a ordenha, secreção de leite sanguinolento, exsudato purulento, flocos de caseína ou dessorado (DIAS, 2007).

Para se identificar os patógenos da mastite no exame microbiológico é necessário isolar o agente causador. Entretanto, um microrganismo do ambiente pode ser considerado como causa de uma infecção intramamária quando ele é isolado em cultura pura de uma única amostra (REIKERINK, 2008). No laboratório, deve-se examinar primeiro o aspecto da cada amostra e, em seguida, proceder à cultura (OLIVER, 2004).

Para obter resposta eficaz no tratamento da doença é necessário realizar o antibiograma, onde se avalia a sensibilidade do agente causador da mastite, proporcionando assim, bases para o tratamento adequado e prevenindo a resistência e cronicidade da afecção. Quando analisados os antibiogramas, espera-se concluir que o tratamento deve ser feito conforme condições da propriedade, buscando não repetir o mesmo princípio ativo, em suspeitas de uso anterior sem sucesso (CLSI, 2008).

A inspeção cuidadosa pelos ordenhadores previamente a cada ordenha é sempre recomendada. Os primeiros jatos de leite devem ser descartados em caneca telada ou de fundo preto e observados quanto à presença de grumos ou qualquer secreção anormal, servindo para detectar a doença em sua fase inicial. À palpação verificam-se os sinais inflamatórios característicos, lesões nos tetos, atrofia de quartos, assimetria e presença de nódulos fibrosos (BRITO; LANGE, 2005).

O Califórnia Mastite Teste é um dos testes mais populares e práticos para o diagnóstico da mastite subclínica, com vantagens de apresentar resultado imediato, ser prático e de baixo custo. Para ter um resultado eficiente deve ser executado por profissionais treinados, caso contrário pode apresentar o inconveniente de resultados falsos – positivos e falsos – negativos. O CMT se baseia na estimativa de células somáticas no leite (LANGONI, 2007). O reagente de CMT é um detergente com indicador de pH, que ao ser misturado ao leite em partes iguais, dissolve as paredes celulares e nucleares dos leucócitos presentes, liberando o material nuclear. O resultado do teste é avaliado em função do grau de gelatinização ou viscosidade da mistura do leite e reagente, sendo realizado em bandeja apropriada (LANGONI, 2007).

As células somáticas são constituídas principalmente pelos leucócitos, cuja função é defesa do organismo. Os leucócitos são constituídos por vários tipos de células. Os encontrados no leite da glândula mamária infectada são: macrófagos (60%), linfócitos (28%), células epiteliais (2-20%), neutrófilos polimorfonucleares (12%), os quais indicam inflamação mamária. A maioria dos leucócitos é atraída do sangue à glândula mamária, em resposta a uma agressão física, química ou infecciosa (principalmente de origem bacteriana) sofrida pela glândula mamária. O processo inflamatório resultante dessa agressão atrai os leucócitos e quando a agressão é muito intensa, os mecanismos de defesa do animal são requeridos a agir com maior intensidade, o que resulta no aumento exagerado de células e de outras substâncias que são também transferidas do sangue para o interior da glândula mamária e, por extensão, para o leite (BRITO, 2007).

A contagem de célula somática é um exame laboratorial usado para o diagnóstico da mastite. É um método convencional e amplamente utilizado para o diagnóstico da mastite subclínica, principalmente em regiões com atividade leiteira mais desenvolvida, sendo uma ferramenta valiosa de ajuda aos produtores de leite na avaliação da presença de mastite nos rebanhos (MATIOLI, 2000).

A contagem de célula somática eletrônica pode ser feita em grande escala, através de contador eletrônico de células somáticas citometria de fluxo, ou em laboratório, por visualização em placas de Petri marcadas (MATIOLI, 2000). Pode ser mensurada em diferentes níveis, porém a CCS do tanque de expansão e a individual do animal são

formas mais frequentes e necessárias para o acompanhamento do status infeccioso dos rebanhos (SILVA, 2006).

A contagem de célula somática individual indica de maneira quantitativa o grau de infecção da glândula mamária; a do leite do tanque de resfriamento reflete a incidência média de mastite no rebanho, sendo boas ferramentas para o controle e prevenção da mastite (MACHADO, 2000). O exame é realizado através de uma amostra do leite afetado, fazendo-se uma cultura em laboratório para identificar o agente causador da mastite, que quando identificado, facilita o tratamento da mesma (SILVA, 2006).

A cultura de bactérias do leite do tanque de expansão é utilizada para identificar agentes contagiosos (AIRES, 2010). Já a análise microbiológica individual é importante para identificação do agente causador da doença, onde através desta identificação torna-se possível determinar a eficácia do tratamento antimicrobiano, mas também para monitorar e controlar a taxa de infecção do rebanho (SEARS; MCCARTHY, 2003).

Os métodos microbiológicos convencionais são os mais utilizados para a detecção de patógenos do leite, apesar da demora na obtenção dos resultados. Os métodos que envolvem a cultura bacteriana são meios não seletivos e seletivos como *Agar-Sangue*, *Agar-TKT* (tálio, cristal violeta, toxina *Estafilocócica*, 5% sangue de carneiro com 1% esculina), *Agar MacConkey* e *Agar cetrimide*, onde são empregados para isolar os agentes da mastite. Seguidos por ensaios bioquímicos para identificar bactérias e de teste para avaliar a suscetibilidade aos antibióticos, como no caso da *Staphylococcus* que cresce bem em *Agar-Sangue*, mas o crescimento é inibido em *Agar-Macconkey* e *Agar-TKT* (SEAR; MCCARTHY, 2003). Os *Staphylococcus aureus* podem produzir halos de hemólise incompleta ou completa em *Agar-Sangue* que diferencia de outros *Staphylococcus*, sendo a confirmação final em nível de espécie feita pelo teste de coagulase e acetoina (SEAR; MCCARTHY, 2003).

Para identificação do agente etiológico *pseudomonas* é utilizado o meio de cultura *Agar cetrimide*, sendo este seletivo e diferencial para a espécie de *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, sendo sua cor âmbar claro e na presença da bactéria torna-se azul ou azul-esverdeado, possui em sua formulação digerido pancreático de gelatina, sulfato de potássio, *Agar*, *cetrimide* e glicerol, demonstrando a capacidade do microrganismo produzir fluoresceína e piocianina (EUROPEAN PHARMACOPEIA 7.0, 2011).

Para a inoculação das amostras de leite, recomenda-se a utilização de meio de cultura não seletivo, como o *Agar Sangue*. Este é o meio sólido mais útil para o isolamento, porque permite diferenciação adequada das colônias. Às vezes, há necessidade de se usar hemácias lavadas (de ovino ou de bovino) na composição do meio, para a observação da hemólise e *S. aureus*, isto porque pode haver anticorpos antialfa e (ou) antibeta hemolisinas no soro do animal doador do sangue, prejudicando a avaliação das colônias e o teste de CAMP (Christie, Atkins e Munch-Peterson). É necessário examinar e interpretar as placas com cuidado, em razão dos microrganismos

contaminantes comuns que surgem nos exames, especialmente quando as condições de coleta não são adequadas. Os contaminantes geralmente se desenvolvem mais rápido e interferem com o resultado do diagnóstico (BRITO, 1999).

O antibiograma é um teste solicitado no diagnóstico da mastite para auxiliar na escolha do antimicrobiano para tratamento, e aumentar as possibilidades de cura. É também essencial para os casos que não apresenta melhora e sugere problema de resistência ao microbiano administrado. Mas, em geral, na rotina do manejo dos casos clínicos, o tratamento da mastite é iniciado logo que se detecta o caso clínico, isto é antes de fazer a cultura, identificação do agente e o antibiograma, isso porque o tempo requerido para cultura necessita de incubação de no mínimo de 24 horas para o crescimento da bactéria e da necessidade do isolamento da bactéria antes de se fazer o antibiograma (CLSI, 2008).

Na interpretação das placas de isolamento primário, considera-se que houve problema de contaminação na coleta da amostra se três ou mais tipos diferentes de colônias são isoladas de um quarto mamário (BRITO, 1999). Os microrganismos do ambiente devem ser isolados em cultura pura para serem considerados responsáveis pela infecção, enquanto *S. agalactiae*, *S. aureus* e *Mycoplasma sp.* são considerados sempre que isolados, se acaso surgir problema de contaminação deve-se examinar uma nova amostra do mesmo quarto mamário para a conclusão do diagnóstico (BRITO, 1999),

Após o isolamento inicial, o exame realizado é o de esfregaço corado pelo método de Gram, para verificar a morfologia e a coloração do organismo isolado, este é o primeiro passo para separar os grupos de micro-organismos, (BRITO, 1999). A separação em Gram-positivo e Gram-negativo pode também ser feita usando-se KOH a 3% (BRITO, 1999).

O método de *Agar sangue MacConkey* é muito útil na identificação presuntiva das bactérias Gram-negativas pela possibilidade de diferenciar, as bactérias fermentadoras da lactose (ex.: *Echerichia coli*, *Klebsiella*, *Eterobacter*) das não fermentadoras (*Pseudomonas*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*) (BRITO, 1999).

O *Ágar Sal Manitol* é um meio de cultura, muito usado para o isolamento de *Staphylococcus aureus* de amostras biológicas como urina, secreções, feridas e exudatos. Também usado na indústria alimentícia para o isolamento e identificação de *Staphylococcus* em líquidos e produtos lácteos, carnes e derivados, incluindo conservas e pescados. O princípio de ação da degradação do manitol com a produção de ácido, muda a cor do meio de rosado a amarelo, devido ao seu alto conteúdo de cloreto de sódio, pode-se fazer uma inoculação maciça da amostra em estudo. Geralmente se incubadas as placas por mais ou menos 36 horas, aparecendo as colônias de *Staphylococcus* não patogênicos de tamanho pequeno e rodeadas de uma zona vermelha. As colônias de *Staphylococcus aureus* fermentadores do manitol são maiores e rodeadas de uma zona amarela (KONEMAN; CURY, 2001).

O teste de oxidase e de oxidação fermentação da glicose (O/F) é utilizado para separar organismos do gênero *Pseudomonas*, que são oxidase positivos e possuem metabolismo oxidativo da glicose (BRITO, 1999).

MATERIAIS E MÉTODOS

O levantamento de dados, através de laudos, foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária da Clínica Escola da CEULJI/ULBRA.

Das explorações em estudos, foram trabalhadas 91 amostras de leite, por meio de análise microbiológicas, durante o período de aproximadamente 270 dias, com início no mês de agosto de 2013 até o mês de abril de 2014. Foi usado o método estatístico STUDENT T. O laboratório recebeu as amostras de leite sendo semeado em Agar Sangue, TSA, Macconkey, Cetrimide, TKT, Sal Manitol. Streptococcus Seletivo, e os testes bioquímicos: Coagulase, Camp-Test, Nitrato, Oxidação e Fermentação, Nitrato, Citrato, SIM, caldo uréia, caldo vermelho de metila Agar Bile Esculina. Sendo realizado também a Coloração De Gram.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As análises e levantamento de informações foram realizadas durante o período de aproximadamente 270 dias, entre agosto de 2013 e abril de 2014. Em 24,17% das amostras não houve crescimento bacteriano. Entretanto 75,83% amostras de leite apresentaram crescimento bacteriano, sendo isolados os seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus* com 25,27%; *Streptococcus spp* com 16,48%; *Escherichia coli* com 9,89%; *Enterobacter* com 8,79%; *Proteus* com 8,79%; *klebisiella* com 3,34%, *Citrobacter* com 1,09%; *Serratia* e *Proteus* com 1,09% e *Staphylococcus* e *Bacilos* com 1,09%.

Os principais agentes etiológicos causadores da mastite são *Staphylococcus spp* e *Streptococcus spp* (BARBALHO, 2001). O mesmo foi encontrado neste experimento, em que se observou que houve maior prevalência para o gênero *Staphylococcus spp*, isolado em 26,36% das culturas e o gênero *Streptococcus spp* apareceu na sequência numérica de importância com isolamento dos patógenos em 16,48%.

A alta prevalência de bactérias do gênero *Streptococcus spp*. não é um achado novo, pois esse gênero é comumente isolado de infecções da glândula mamária tanto de bovinos quanto de bubalinos. Ressaltam ainda que o controle dos *Streptococcus spp*. tem sido difícil em razão da ampla distribuição e descrição imprecisa das espécies, o que tem dificultado estudos epidemiológicos (SANTOS, 2006).

Há vários micro-organismos envolvidos na etiologia da mastite, considera-se que O *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* são responsáveis por aproximadamente 80% dos casos. Menos de 8% são causadas por *Corynebacterium bovis*, *Pseudomonas sp*, *Mycobacterium Sp*, *Serratia Sp*. (RANJAN, 2006). As infecções causadas por *E. coli* são tipicamente, mas não exclusivamente, associadas a uma resposta imune mais rápida e intensa, onde infecções por *S. uberis* são caracterizadas por resposta lenta e menos intensa. Em contrapartida, *S aureus* é capaz de burlar a resposta do sistema imune e sua infecção é procedida de resposta moderada do hospedeiro (RINALDI, 2010).

Nas amostras de leite coletadas na microrregião de Ji-Paraná/RO, e analisadas, foram apresentados os agentes etiológicos *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae*, que em sua maioria obtêm resultado significativo de acometimento nos animais. *Streptococcus dysgalactiae*, e *Streptococcus agalactiae* vem sendo considerado alguns dos principais agentes causadores da mastite bovina com uma prevalência de 60% nos rebanhos (KEEFE, 2012).

Staphylococcus sp., conhecido também como *Estafilococcus coagulase* positivo, destaca-se como principal agente etiológico causador de mastite de maior importância e de tratamento difícil, devido à resistência bacteriana. O leite contaminado por estes microrganismos pode representar riscos à saúde pública em decorrência de cepas capazes de produzir toxinas termorresistentes, os quais estão relacionados à patogenicidade e aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos disponíveis (RIBEIRO, 2009). Nas amostras os *Staphylococcus aureus* atingiram um percentual de 25,27%. Sendo este considerado o maior agente causador de mastite bovina nos rebanhos leiteiros, sendo praticamente impossível a sua erradicação (BRITO; BRITO, 1998).

Os prejuízos em decorrência da mastite representam um declínio resultante de 70% devido à redução na produção dos quartos mamários com mastite subclínica; 14% por desvalorização dos animais pela redução funcional dos quartos acometidos e descarte precoce do animal ou morte; 8% pela perda do leite descartado por mastite bovina, pela presença de resíduos após tratamento; 8% pelos gastos com tratamentos e gasto com veterinários e despesas com medicamentos (ZAPPA, 2011).

Os resultados obtidos foram realizados por meio de amostras verificadas via exames, realizadas no laboratório de microbiologia do Centro Universitário Luterano de Ji-Paraná/RO, que oportunizaram as realizações de procedimentos necessários para que se isole os principais gêneros bacterianos causadores da mastite apresentado nas amostras.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite é uma patologia presente nos rebanhos leiteiros. Resulta em maior descarte de animais, gastos com medicamentos, redução na produção e descarte de leite, causando forte impacto negativo no setor financeiro das propriedades rurais e, conseqüentemente, perdas de grande magnitude para o produtor. Por isso, é preciso tomar medidas eficazes de prevenção e controle para se obter a diminuição dessa patologia.

O leite oriundo de vacas infectadas apresenta modificação em sua composição, decorrente de alterações das características organolépticas, físicas, químicas e microbiológicas, o que causa uma forte preocupação à saúde pública. Deve-se, portanto, encontrarem-se medidas preventivas para o controle da mastite nos rebanhos.

Observou-se, entre os gêneros bacterianos presentes em casos de mastites em vacas leiteiras na microrregião de Ji-Paraná/RO, que se encontram em maiores porcentagens o *Staphylococcus Aureus*, o *Streptococcus Sp* e o *Escherichia Coli*.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. C. P. Mastites em Bovinos: caracterização etiológica, padrões de sensibilidade e implementação de programas de qualidade do leite em explorações do Entre-Douro e Minho. Dissertação (Mestrado em Medicina veterinária) – *Universidade Técnica de Lisboa*, Lisboa, p.87, 2010.
- BARBALHO, T. C. F.; MOTA, R. A. Isolamento de agentes bacterianos envolvidos em mastite subclínica bovina no Estado de Pernambuco. *Rev. Bras. Saúde Prod*, v.2, n.2, p.31-36, 2001.
- BENEDETTE, M. F.; SILVA, D.; ROCHA, F. P. C. Mastite Bovina. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, n.11, 2008.
- BEXIGA, R.; CAVACO, L.; VILELA, C. L. Isolamento de *Prototheca zopfii* a partir de leite bovino. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 2003.
- BLOWEY, R.; EDMONDSON, P. *Mastitis: causas, epidemiología y control*. 2.ed. London: Cab, p.266, 2010.
- BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; MORAES, L. C. D.; ARCURI, E. F., et al. Adoção de boas práticas agropecuárias em propriedades leiteiras da Região Sudeste do Brasil como um passo para a produção de leite seguro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, n.2, p.125-131, 2007.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; PORTUGAL, J. A. B. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.57, n.327, p.83-88, 2002.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; RIBEIRO, M. T.; VEIGA, V. M. Padrão de infecção intramamária em rebanhos leiteiros: exame de todos os quartos mamários das vacas em lactação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.51, n.2, p.129-135, 1999.
- BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SOUZA, H. M.; VARGAS, O. L. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.18, n.1, p.39-44, 1998.
- BRITO, M. A. V. P.; LANGE, C. C. Resíduos de antibióticos no leite. *Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite*, p.10, 2005.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria inaccessible from animals. *Approved Standard-3 ed*, v.28, n.8, p.116, 2008.
- COSER, S. M.; LOPES, M. A.; COSTA, G. M. Mastite bovina: controle e prevenção. In: *Boletim Técnico Universidade Federal de Lavras*, n.93, p.1-30, 2012.
- DIAS, R. V. C. Principais métodos de diagnóstico e controle da mastite bovina. *Acta Veterinaria Brasílica*, Manaus, v.1, n.1, p.23-27, 2007.
- MANEJO DE GADO DE LEITE. Manejo sanitário voltado ao controle da mastite bovina. In: *Cartilha para o produtor de leite de Rondônia*. Porto Velho, RO: Embrapa Rondônia, p.40, 2007.
- EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 7.0, IV. Contentes Of the 7 th Edition. 2011.
- FARIA, J. E. Prevenção e controle de infecção estafilocócica da glândula mamária pela vacinação e/ou antibioticoterapia associada ao dimetilsulfóxido (DMSO). Dissertação (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, *Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 1995.

FONSECA, L. F. L. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo: Manole, 2007.

FOX, L.K. Prevalence, incidence and risk factors of heifer mastitis. *Veterinary Microbiology*, n.134, p.82-88, 2005.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, S. S. A.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A. Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus* coagulase positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, 2005.

GOMES, M. J. P. Gênero *Streptococcus* spp. Favet – Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, p.1-76, 2013.

GREENE, C. E. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3.ed. Canada: Saunders/Elsevier. 1387p. 2006.

KEEFE, G. Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics Food Animal*, Philadelphia, v.28, p.203-216, 2012.

KONEMAN, E. W.; CURY, A. E. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LANGONI, H.; PINTO, M. P.; DOMINGUES, P. F.; LISTONI, F. I. P. Mastite bovina subclínica: etiologia e sensibilidade bacteriana. *Comunicação Científica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Pirassununga, v.14, 2007.

LANGONI, H.; GUIDUCE, M. V. S.; NOBREGA, D. B.; DA SILVA, R. C.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; SALINA, A.; GUIMARAES, F. F. Research of Klebsiella pneumoniae in dairy herds. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.35, n.1, p.9-12, 2015.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRIES, G. A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua Contagem de Células Somáticas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.1883-1886, 2000.

MARONEY, M.; RUEGG, P. L.; TAYAR, F.; REINEMANN, D. J. Use of Lactocorder TM to evaluate milking routines. *Proc 43 rd Annual Meeting of the National Mastitis Council*. Charlotte, NC, p.341-342, 2004.

MATIOLI, G. P.; PINTO S. S. M.; BARBANO, D. M. Effect of milk from cows with mastitis on the production of fresh minas cheese. *Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes*, Juiz de Fora, 2000.

MEDEIROS, Elizabeth S. et al. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* sp. isoladas de vacas com mastite subclínica. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v.29, n.7, 2009.

MEHZRA, J. et al. Increase in Escherichia coli Inoculum Dose Accelerates CD8 T-Cell Trafficking in the Primiparous Bovine Mammary Gland. *Journal of dairy Science*, v.91, n.1, 2008.

MELO, P. C. Estudo fenotípico e genotípico da produção de biofilmes por estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas dos casos de mastite subclínica bovina, p.200, 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal. 2008.

- MOTA, R. A. et al. Participação dos *Staphylococcus spp* na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no Estado de Pernambuco (Brasil). *Ci. Anim. Bras.*, v.13, n.1, p.124-130, 2012.
- NAKIB, M. A. et al. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. *Journal of Microbiological Methods*, v.85, 2011.
- NICHOLAS, R. A. J.; AYLING, R. D. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.*, v.74, p.105-112, 2003.
- OLIVER, S. P.; GONZÁLEZ, R. N.; HOGAN, J. S.; JAYARAO, B. M.; OWENS, W. E. Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality. 4 ed. Verona, WI: National Mastitis Council, p.47, 2004.
- PETZER, I. M. et al, Intramammary infection rate during the dry period in cows that received blanket dry cow therapy: efficacy of 6 different dry-cow intramammary antimicrobial products. *Jl S.Afr.vet.Ass.*, n.80, n.1, p.23-30, 2009.
- PHILPOT, W. N.; NICKERSON, S. C. *Mastitis: Counter a attack*. Naperville, Illinois: Babson Bros, 2002.
- PICCININI, R. et al. Study of *Staphylococcus Aureus* collected at slaughter from dairycows with chronic mastitis. *Journal of dairy research* v.79, n.2, 2012.
- PRESTES, D. S.; FILAPPI, A.; CECIM, M. Susceptibilidade à mastite: fatores que a influenciam – uma revisão. *Revista da FZVA Uruguaiana*, v.9, n.1, p.118-132. 2002.
- PRESTES, N. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. *Obstetrícia Veterinária*, Rio de Janeiro, p.97-99. 2006.
- PRETTO, L. G.; MÜLLER, E. E.; FREITAS, J. C.; METTIFOGO, E.; BUZINHANI, M.; YAMAGUTI, M.; SALVADOR, R. Mastite bovina por *Mycoplasma bovis* em rebanhos leiteiros. *Pesqui. Vet. Bras.*, v.21, p.143-145, 2011.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- RADOSTITS, O. M. et al. Mastite. In: *Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, caprinos e equinos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Cap.15, p.541-629, 2002.
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R. C.; NANDI, D. Bovine protothecal mastitis: A review. *Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Res.* v.1, p.1-7, 2006.
- RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y: Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 1998.
- REIKERINK, O. R. G.; BARKEMA, H.; KELTON, D.; SCHOLL, D. incident rate of clinical mastitis on Canadian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.1366-1377, 2008.
- RIBEIRO, M. G. et al. Micro-organismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. *Revista Pesquisa Veterinária Brasileira*, São Paulo-SP, v.29, n.1, p.52-58, 2009.
- RINALDI, M.; LI, R. W.; BANNERMAN, D. D.; DANIELS, K. M.; EVOCK-CLOVER, C.; SILVA, M. V. B.; PAAPE, M. J.; CAPUCO, A. V.; BURVENICH, C.; RYSSSEN, B. V.; A sentinel function for teat tissues in dairy cows: dominant innate immune response

elements define early response to *E. coli* mastitis. *Functional e integrative genomics*, v.10, n.1, p.21-38, 2010.

SANTOS, F. G. B.; MOTA, R. A.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; SOUZA, H. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; JOHNER, J. M. Q.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P.; LEAL-BALBINO, T. C. Tipagem molecular de *Staphylococcus aureus* isolados do leite de vacas com mastite subclínica e equipamentos de ordenha procedentes do estado de Pernambuco. *Revista Napgama*, v.6, n.1, p.19-23, 2003.

SANTOS, L. L., et al. Mastites clínicas e subclínicas em bovinos leiteiros ocasionadas por *Staphylococcus coagulase-negativa*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, v.70, n.1, p.1-7, 2011.

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

SANTOS, M. V.; *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. Barueri: Manole, 2010.

SCHUKKEN, Y. H, Host-response patterns of intramammary infections in dairy cows. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.144, n.3-4, p.270-289, 2011.

SEAR, P. M.; McCARTHY, K. K. Diagnosis of mastitis of therapy decisions. *Veterinary Clinics of North American Food Animal Practice*, 2003.

SILVA, M. V. M.; ARAÚJO, K. P. C. Mastite e qualidade do leite. *Rev. Vet. Zootec.*, v.15, p.20-23, 2008.

SILVA, W. R. Antibiograma. Disponível em: <http://www.portaleducacao.com.br/biologia/artigos/23026/antibiograma>. Acesso em: 8 jul. 2016.

WATTS, J. I. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol*, v.16, n.1, p.41-6, 1988.

ZAFALON L. F.; ARCARO, J. R. P.; NADER FILHO, A.; FERREIRA, L. M.; CASTELANI, L.; BENVENUTTO, F. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação, *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, v.67, n.2, 2008.

ZAPPA, V. *Mastite em vacas leiteiras*. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Graça, SP, n.16, 2011.

ZENI, F. *A importância da qualidade da ordenha no controle de mastite bovina*. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, 2012.