

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRONÔMICA

MILENA APARECIDA SCABELLO

**Análise do perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias envolvidas em
casos de mastite ovina**

BURI (SP)

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRONÔMICA

MILENA APARECIDA SCABELLO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Engenharia
Agrônômica para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Agrônômica.

Orientação: Prof. Dr. Danilo Tancler
Stipp

Financiamento: Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e
Tecnológico (CNPQ)

Buri (SP)

2023

Scabello, Milena Aparecida

Análise do perfil de resistência à antimicrobianos de bactérias envolvidas em casos de mastite ovina. / Milena Aparecida Scabello -- 2023.
26f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus Lagoa do Sino, Buri
Orientador (a): Danilo Tancler Stipp
Banca Examinadora: Thais Jordânia Silva, Daniel Mendes
Borges Campos
Bibliografia

1. Ovinocultura. 2. Ruminantes. 3. Mastite. I. Scabello,
Milena Aparecida. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Lissandra Pinhatelli de Britto - CRB/8 7539

MILENA APARECIDA SCABELLO

ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ENVOLVIDAS EM CASOS DE MASTITE OVINA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título
de Bacharel em Engenharia Agrônômica pela
Universidade Federal de São Carlos.

Aprovado em: 29 / 03 / 2023.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **DANILO TANCLER STIPP**
Data: 30/03/2023 13:36:38-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp (Orientador)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Documento assinado digitalmente
 **THAIS JORDANIA SILVA**
Data: 29/03/2023 13:41:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Thaís Jordânia Silva
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL MENDES BORGES CAMPOS**
Data: 30/03/2023 09:20:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Daniel Mendes Borges Campos
Universidade Federal de São Carlos
(UFSCar)

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado a oportunidade de viver e desfrutar desse momento.

Ao meu avô João Onivaldo Scabello (em memória), meu amigo e grande incentivador.

Meus amigos e colegas de graduação que tornaram essa jornada mais leve principalmente em tempos de pandemia: Luara, Guilherme, Gabriel Matos, Jade, Vitória, Michele e Rafael, apenas gratidão.

Aos mestres, em especial ao Prof. Robson, que me auxiliaram durante um dos períodos mais desafiadores da minha graduação, o meu muito obrigada!

Aos meus pais que com o suor do trabalho árduo do campo me possibilitaram a educação que tenho hoje, essa conquista também é de vocês.

RESUMO

Na ovinocultura uma das principais doenças na atividade produtiva é a mastite. Os agentes causais da patologia incluem bactérias como: *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, corinebactérias, bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., além de fungos. O presente trabalho teve por objetivo principal avaliar o perfil de bactérias em casos de mastite ovina. Através do isolamento *in vitro* das amostras coletadas, e dos testes de antibiograma. Pode-se constatar que na maioria dos estudos prevalece a incidência de mastite em decorrência *Staphylococcus* spp. envolvidas em mastites infecciosas. Casos de mastite subclínica, também foram identificadas a enterobactérias como a *Salmonella* sp. Caracterizado como mastite ambiental. O uso indiscriminado de antimicrobianos acarreta vários problemas no sistema produtivo, devido à resistência das bactérias, e a ineficácia dos antimicrobianos. O delineamento experimental se deu selecionando dois produtores com casos de mastite no rebanho, localizados nas cidades de São Manoel e Botucatu-SP, ambas classificadas como subtropical úmido. Foram separados 10 animais, que originaram 20 amostras (teto direito e esquerdo), as amostras foram colhidas em frascos estéreis, e refrigerados onde foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do campus UFSCar Lagoa do Sino, para a identificação bacteriana, e os testes de resistência a antimicrobianos. Identificou-se duas bactérias da família *Enterobacteriaceae* predominantes no estudo, a *Salmonella* spp., e a *Escherichia Coli*. Logo após realizou-se os testes de antibiograma e utilizou-se para o estudo os seguintes antimicrobianos: Gentamicina 120µg, Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg, Sulfazotrim 25µg, Ciprofloxacina 5µg, Azitromicina 15µg e Tetraciclina 30µg, que apresentou as seguintes porcentagens de resistência para determinada bactéria, *Salmonella* sp. : Gentamicina (11,28%), Ciproflaxacina (22,22%), Tetraciclina (77,77%), Azitromicina (88,88), Amoxicilina e Sulfazotrim (ambos 100%). E *Escherichia Coli*: Gentamicina (27,28%), Ciproflaxacina (54,54%), Tetraciclina (45,45%), Azitromicina e Amoxicilina (ambos 81,81%), Sulfazotrim (90,90%). Os casos de enterobactérias em mastite, apontam que a causa das mesmas é a de origem ambiental. Pode-se dizer que as bactérias apresentaram resistência múltipla, há mais de um antimicrobiano. Embora pertençam a mesma família das bactérias, a *Salmonella* sp., possui um perfil um tanto mais agressivo quanto a *Escherichia Coli*, e não se descarta a possibilidade de os animais do estudo apresentarem a salmonelose, fazendo com que os antibióticos não surtam efeito. Contrastando com os resultados obtidos em literatura, pode-se dizer que a mastite subclínica é prevalente em ambos os casos, confirmando assim a tese de que é necessário utilizar métodos de identificação da mesma, e terapêuticas alternativas no tratamento.

Palavras-Chave: *Susceptibilidade; Leite Ovino; Mastite; Antibióticos.*

ABSTRACT

In sheep farming one of the main diseases in the productive activity is mastitis. The causal agents of the pathology include bacteria such as: *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, corynebacteria, bacteria of the genus *Staphylococcus* spp., in addition to fungi. The main objective of this work was to evaluate the profile of bacteria in cases of ovine mastitis. Through in vitro isolation of collected samples, and antibiogram tests. It can be seen that in most studies the incidence of mastitis due to *Staphylococcus* ssp. involved in infectious mastitis. Cases of subclinical mastitis have also been identified with enterobacteria such as *Salmonella* sp. Characterized as environmental mastitis. The indiscriminate use of antimicrobials causes several problems in the production system, due to the resistance of bacteria, and the ineffectiveness of antimicrobials. The experimental design was carried out by selecting two producers with cases of mastitis in their herd, located in the cities of São Manoel and Botucatu-SP, both classified as humid sub-tropical. 10 animals were separated, which originated 20 samples (right and left ceiling), the samples were collected in sterile flasks, and refrigerated where they were taken to the microbiology laboratory of the UFSCar Lagoa do Sino campus for bacterial identification, and resistance tests to antimicrobials. Two bacteria of the *Enterobacteriaceae* family predominant in the study were identified, *Salmonella* sp., and *Escherichia coli*. Soon after, the antibiogram tests were performed and the following antimicrobials were used for the study: Gentamicin 120µg, Amoxicillin + Clavulanic Acid 20/10µg, Sulfazotrim 25µg, Ciprofloxacin 5µg, Azithromycin 15µg and Tetracycline 30µg, which presented the following percentages of resistance to a certain bacterium, *Salmonella* sp.: Gentamicin (11.28%), Ciprofloxacin (22.22%), Tetracycline (77.77%), Azithromycin (88.88), Amoxicillin and Sulfazotrim (both 100%). And *Escherichia coli*: Gentamicin (27.28%), Ciprofloxacin (54.54%), Tetracycline (45.45%), Azithromycin and Amoxicillin (both 81.81%), Sulfazotrim (90.90%). The cases of enterobacteria in mastitis indicate that the cause is of environmental origin. It can be said that the bacteria showed multiple resistance, there is more than one antimicrobial. Although they belong to the same family of bacteria, *Salmonella* sp., has a somewhat more aggressive profile than *Escherichia coli*, and the possibility that the study animals present salmonellosis, causing the antibiotics to have no effect, is not ruled out. Contrasting with the results obtained in the literature, it can be said that subclinical mastitis is prevalent in both cases, thus confirming the thesis that it is necessary to use methods of identifying it, and alternative therapies in the treatment.

Key words: Susceptibility; Sheep Milk; Mastitis; Antibiotics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção nacional de leite ovino.....	13
Tabela 2: Perfil de sensibilidade de microrganismos isolados na região de Bauru, SP.....	16
Tabela 3: Perfil de sensibilidade de microrganismos isolados em estudo prévio na região de Botucatu, SP.....	16
Tabela 4: Identificação de bactérias e porcentagem de resistência de ovelhas com mastite sub-clínica submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos.....	20
Tabela 5: Resultados obtidos a partir da bateria de exames das amostras analisadas.....	21

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Produção mundial de leite ovino	11
3.1.1 Produção de leite ovino no Brasil	11
3.1.1.1 Características do leite ovino	13
3.1.1.2 Importância da mastite ovina em rebanhos brasileiros.....	14
3.2 Resistência e sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. <i>Análise da literatura:</i>	17
4.2. <i>Amostras e critérios de inclusão no estudo:</i>	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Terapias alternativas no tratamento	23
6. CONCLUSÃO	24
7. REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

A mastite é uma das doenças mais importantes na atividade em rebanhos leiteiros de todas as categorias, compreendendo uma extensa etiologia ocasionada por microrganismos (PEIXOTO; MOTA; COSTA, 2010). A doença caracteriza-se por uma inflamação mamária, prejudicando a produção de leite e conseqüentemente influenciando na qualidade do leite oferecido em fase de lactação, reduzindo ganho de peso e levando a mortalidade dos mesmos (PEIXOTO *et al.*, 2010).

O leite ovino é de extrema importância na produção de queijos, e apresenta um elevado valor agregado, entretanto, com a incidência da mastite aproximadamente 46% dos animais são descartados pois perdem metade da capacidade de produção de leite, levando em consideração que cada teto é independente, gerando um grande prejuízo econômico para ovinocultores. Como em todos os mamíferos a doença necessita que microrganismos rompam a barreira imunológica, sendo estes mais vulneráveis logo após darem à luz, instalando-se através do canal do teto, podendo progredir para toda a glândula mamária (LUCHEIS; HERNANDES; TRONCARELLI, 2010).

Os agentes causais da mastite envolvem as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Mannheimia haemolytica*, corinebactérias, bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., e também podem ser ocasionados por fungos que infectam o rebanho instalando infecções intramamárias, porém a prevalência é reduzida (BERRIATUA *et al.*, 2001).

O uso indiscriminado de antimicrobianos advindos da terapia empregada em bovinos acarreta uma série de problemas na atividade, levando a criar bactérias multirresistentes por conta da concentração dos antibióticos e a restrita disponibilidade de princípios ativos liberados para ovinos.

Foram realizados estudos que monitoravam a prevalência de bactérias em envolvidos de mastite, e elencou-se quais antimicrobianos surtiram mais efeitos em testes *in vitro*. Entretanto, ainda é necessário o acompanhamento periódico de testes *in vitro* para avaliar uma terapêutica adequada aos ovinocultores (LUCHEIS; HERNANDES; TRONCARELLI, 2010).

2. OBJETIVOS

Analisar amostras de isolados bacterianos *in vitro* e avaliar a prevalência da doença e seu comportamento diante da utilização de antimicrobianos utilizados conhecidos no mercado.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Produção mundial de leite ovino

A produção de queijos de ovelhas e cabras é muito tradicional em países que estão localizados ao redor do Mar Mediterrâneo. A atividade possui uma participação significativa no cenário mundial, sendo que nessa região cerca de 60% das ovelhas são ordenhadas destinando 95% dessa produção para a indústria de queijos Feta, Roquefort, Pecorino, Romano, Manchego, etc., a carne ovina é considerada subproduto, levando em consideração que $\frac{2}{3}$ da produção mundial é produzida ali (ROHENKOHL *et al.*, 2011).

Na década de 70-90 houve uma grande evolução na produção de rebanhos de ovinos leiteiros na França. Estima-se que no início dos anos 90 a produção nacional era de 181,9 milhões de litros/ano, originando cerca de 70% de leite ovino destinado à indústria queijeira (ROHENKOHL *et al.*, 2011).

3.1.1 Produção de leite ovino no Brasil

O agronegócio brasileiro é considerado atualmente o principal setor que impulsiona a economia, sendo responsável por uma expressiva parte do PIB (Produto Interno Bruto), desde 1960 o setor vem se intensificando, aumentando ganhos em produtividade e sustentabilidade em diversas cadeias agroindustriais (MONTEIRO; BRISOLA; VIEIRA FILHO, 2021).

Por muitos anos a ovinocultura foi colocada a margem de outras atividades consideradas mais importantes, todavia estudos relacionados à cadeias produtivas regionais e locais vieram a colaborar com a desmistificação acerca do assunto, reafirmando sua notoriedade (MONTEIRO; BRISOLA; VIEIRA FILHO, 2021).

A produção de leite ovino, vem como uma alternativa para pequenos produtores sendo uma opção relativamente de baixo investimento inicial, e de fácil adoção por parte da mão de obra familiar. Exceto situações onde a produção é

caracterizada como de subsistência onde o consumo é *in natura*, grande parte da produção brasileira é destinada a produção de queijos e iogurte (CHAVES *et al.*, 2009).

Entretanto a cadeia caprinos e ovinos enfrentou diversas dificuldades em questões relacionadas aos desempenhos zootécnicos e econômicos por parte de pequenos produtores, entre os principais problemas enfrentados na atividade, destaca-se a desorganização social, informalidade nas transações comerciais, falta de fomento à assistência técnica qualificada (SANTOS *et al.*, 2019).

A ovinocultura leiteira é uma atividade já consolidada em países Europeus e Asiáticos, na América Latina a exploração de ovinos leiteiros iniciou-se nos anos 60 na Argentina, e posteriormente no Rio Grande do Sul, com a inserção da raça Lacaune pela cabanha Dedo Verde há cerca de 30 anos, e também a implantação do primeiro laticínio especializado (FIGUEIRA; ALVES; FONSECA, 2018). A raça apresentou um grande potencial produtivo, pois a fêmea adulta chega a produzir quatro litros de leite por dia, no pico da lactação, que ocorre ao redor dos 30-35 dias pós-parto. Durante o período de lactação, aproximadamente 150 dias, uma ovelha produz em média 1,9 litro por dia (FIGUEIRA; ALVES; FONSECA, 2018).

Após a implementação, a raça foi disseminada para outros estados brasileiros sendo eles: Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Distrito Federal, a partir do mesmo material genético importado em 1992, somente em 2012 houve uma importação de material genético significativo (SILVEIRA, 2017).

Atualmente, as principais regiões produtoras no território brasileiro se concentram nas regiões Sul e Sudeste pois possuem iniciativas para a produção de leite com o intuito da produção de laticínios em geral, com registros nos Sistemas de Inspeção Federal, Estadual e Municipal (SANTOS *et al.*, 2019). A tabela a seguir, demonstra dados sobre a produção nacional de leite ovino.

Tabela 1: Produção nacional de leite ovino

Estado	Produtores	Animais	Laticínios	Produção anual de leite (L)
Rio Grande do Sul	7	2.000	4	270.000
Santa Catarina	4	2.400	3	315.000
Paraná	2	500	2	15.000
São Paulo	6	600	6	60.000
Rio de Janeiro	3	350	3	45.000
Minas Gerais	4	950	4	130.000
Distrito Federal	2	100	2	5.000
Total	28	6.900	24	840.000

Fonte: (FIGUEIRA; ALVES; FONSECA, 2018).

A produção é considerada satisfatória pois apresenta um bom rendimento no seu beneficiamento. Com aproximadamente cinco litros de leite de ovelha é possível fazer um quilo de queijo (CASA DA OVELHA, 2009), entretanto como dito, a atividade ainda é incipiente no Brasil. Tendo em vista a produção queijeira, nicho mercadológico que vem tomando cada vez mais espaço atualmente, o processamento industrial corresponde a 0,0019% se comparado a produção total leiteira, a atividade apresenta potencialidades nos Estados de Santa Catarina, e Minas gerais, levando em consideração o cenário de aumento de derivados lácteos em expansão no país (FARIAS *et al.*, 2017).

3.1.1.1 Características do leite ovino

Conhecido pela sua riqueza em sólidos, o leite ovino raramente é consumido na forma *in natura*, mas possui uma grande utilização na fabricação de queijos. A composição e as características físico-química do leite são informações muito importantes para o processamento.

Na forma *in natura* apresenta um alto teor de cálcio e proteína de qualidade, sendo que para a produção e queijos, esses fatores influenciam e muito no rendimento e qualidade do produto final. A composição média do leite ovino pode variar de 6,35 a 9,40% no teor de gordura, 3,30 a 5,00% no teor de proteína e 3,70 a 5,16% no teor de lactose (KREMER *et al.*, 1996), também ocorre a variação por conta de fatores como a raça, manejo nutricional, idade da ovelha e estágio da lactação (KREMER *et al.*, 1996).

3.1.1.2 Importância da mastite ovina em rebanhos brasileiros

A mastite caracteriza-se por uma reação inflamatória na glândula mamária apresentando-se em dois aspectos: clínico e subclínico, onde a mastite clínica é caracterizada por alterações nas características físico-químicas do leite, e sintomas aparentes no animal infectado. A identificação em animais com a condição subclínica é dificultada por conta da ausência de sintomas. Dentre as principais bactérias causadoras de mastite clínica pode-se citar *Staphylococcus aureus* e, *Streptococcus agalactiae*, destacando-se ainda *Mannheimia haemolytica*, essa bactéria é principal de doenças respiratórias em ruminantes, podendo causar pneumonia em bovinos, ovinos e caprinos, septicemia em cordeiros e mastite em ovelhas, coloniza-se principalmente na mucosa nasal desses animais (ARAUJO; COSTA; ECCO, 2009), com raras ocorrências de *Escherichia coli*, bactéria gram negativa que possui estrutura bacilar, da ordem das ENTEROBACTÉRIAS, localizadas no trato intestinal dos animais.

Apesar de relatados poucos casos atrelados a este grupo de bactérias, a prevalência de casos de mastite pode ser relacionado a condições precárias de higiene no aprisco ou local de descanso dos animais (SILVA *et al.*, 2010).

Fatores externos como ferimentos, estresse, e quesitos anatômicos também são meios para o desenvolvimento da doença (TOZZETTI *et al.*, 2008). As bactérias do gênero estafilococos, são comuns tanto em humanos, quanto em animais, esse patógeno é caracterizado por serem gram positivas, e esféricas, são considerados os principais agentes causais de infecções intramamárias em mamíferos. (COELHO *et al.*, 2006).

Já os casos subclínicos são caracterizados por: *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) são os principais agentes envolvidos, seguidos de *Staphylococcus aureus* (BERGONIER *et al.*, 2003; ZAFALON *et al.*, 2017). Ainda podemos citar agentes como, *Pseudomonas* spp., *Corynebacterium pseudotuberculosis* e *Acholeplasma oculi* (RADOSTITS *et al.*, 2007). As espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e a *Pasteurella haemolytica*, separadamente ou em associação com outros agentes, são responsáveis por cerca de 80% dos casos de mastite (DOMINGUES; LEITE, 2014).

A forma clínica da doença é facilmente diagnosticada, pois apresenta alterações visíveis no úbere, enquanto a mastite subclínica necessita de meios para

seu diagnóstico através do aumento da contagem de células somáticas (CCS). O mais comum e utilizado é o CMT (*California Mastitis Tests*), pois pode ser realizado no campo e possui um custo baixo (PEIXOTO *et al.*, 2010).

Staphylococcus Coagulase Negativos são considerados os principais agentes etiológicos de mastite subclínica em ovelhas, sendo necessário a realização de testes para a sua detecção. Além disso, as toxinas estafilocócicas são um problema de saúde pública, pois se desenvolve na pessoa que ingeriu o leite, ou derivado uma intoxicação alimentar, desconforto gástrico, sudorese e cefaleia.

Embora haja informações limitadas sobre a produção de leite e a ocorrência de mastites em ovinos no Brasil, a maioria das raças são criadas para produção de carne ou lã. O primeiro caso de mastite no país foi relatado por FERNANDES; CARDOSO (1985). Quando no Rio Grande do Sul ocorreu um surto de mastite por *S. aureus*.

A etiologia da mastite é bastante diversificada, sendo a mais comum a de origem bacteriana. Os patógenos envolvidos possuem fatores de virulência que promovem a colonização e infecção da glândula mamária mais rapidamente. Como exemplos destes fatores podemos citar sua estrutura capsular, o que permite a aderência bacteriana às células epiteliais, além de dificultar a fagocitose e, conseqüentemente, a destruição pelos neutrófilos (CARNEIRO; DOMINGUES; VAZ, 2009).

3.2 Resistência e sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos

Em estudo realizado no interior de São Paulo na região de Bauru, foram coletadas amostras de leite ovino de 159 animais da raça Santa Inês em 20 propriedades, originando posteriormente 309 isolados, analisou-se a grande maioria de infecções que estão relacionadas com bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. apresentando resultados satisfatórios a sensibilidade a antimicrobianos utilizados no teste. (LUCHEIS; HERNANDES; TRONCARELLI, 2010). Dentre as drogas utilizadas no estudo, pode-se destacar: Gentamicina, Tetraciclina, Penicilina, Neomicina, Ampicilina, Oxacilina, Cefalotina e Sulfazotrim, as quais apresentaram a seguinte sensibilidade de acordo com a tabela a seguir:

Tabela 2: Perfil de sensibilidade de microrganismos isolados na região de Bauru, SP.

(%) De microrganismos sensíveis				
Antimicrobiano	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativo	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
Gentamicina	94,1	83,3	89,3	82,3
Tetraciclina	32,3	66,6	92,8	76,5
Penicilina	75,3	75	89,3	23,5
Neomicina	72,9	83,3	85,7	70,6
Ampicilina	74,1	66,6	85,7	17,6
Oxacilina	82,3	66,6	75	29,4
Cefalotina	91,8	83,3	85,7	70,6
Sulfazotrim	43,5	25	53,6	52,9

Fonte: Adaptado de LUCHEIS; HERNANDES; TRONCARELLI (2010).

O estudo preliminar realizado em 2019 analisou também alguns isolados de *Escherichia coli*, e *Salmonella* ssp. Onde avaliou-se uma resistência considerável das bactérias como exposto na tabela a seguir:

Tabela 3: Perfil de sensibilidade de microrganismos isolados em estudo prévio na região de Botucatu, SP

(%) De microorganismos sensíveis		
Antimicrobiano	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> ssp.
Sulfazotrim	9,09	0
Amoxicilina + ácido clavulânico	18,1	0
Tetraciclina	54,5	22,2
Gentamicina	72,7	88,8
Ciprofloxacina	45,4	77,7
Azitromicina	18,1	11,1

Fonte: Próprio autor, (2019).

Avaliou-se uma incidência considerável de resistência em comparação aos dois tratamentos, pois no estudo realizado em Bauru os animais apresentavam a mastite subclínica, a forma mais complicada de se identificar a mastite, pois não dá sinais

externos. Enquanto que no estudo realizado em Botucatu os animais apresentavam um quadro de mastite clínica originalmente ambiental, sendo animais mais debilitados, e com o quadro recorrente da doença, explicando pois o resultado apresentado. (Dados ainda não publicados).

A terapêutica utilizada também influenciou os animais que apresentaram maiores resistências, pois os mesmos já apresentavam casos recorrentes de mastite. As drogas mais eficazes foram a gentamicina em ambos os estudos, já o sulfazotrim, pode-se dizer que apresentou uma seletividade em diversas bactérias.

Em outro estudo realizado no Oeste de Santa Catarina observou-se também que há a prevalência de *Staphylococcus* ssp. Envolvidos em casos de mastite subclínica, e analisou-se a susceptibilidade *in vitro* onde a associação entre lincomicina/estreptomicina e josamicina + trimetoprim apresentaram melhores resultados (DRESCHER *et al.*, 2010). Assim como no estudo realizado no Estado de Minas Gerais, onde confirma-se a mesma teoria apresentada (MORAIS *et al.*, 2011).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análise da literatura:

O trabalho contou com duas fases de execução, onde compilou-se informações obtidos em base de dados como: Google Acadêmico, PUBMED, *Scielo*, Revistas Agrônomicas, *Research Gate*, Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, Periódicos CAPES, onde sintetizamos os trabalhos para podermos comparar com dados obtidos em pesquisa preliminar realizada em 2019. Para a realização da segunda fase do trabalho, foram visitadas duas propriedades no interior de São Paulo, de cooperados da ASPACO (Associação Paulista de Criadores de Ovino), localizados nas cidades de São Manoel (Latitude: 22° 44' 52" Sul, Longitude: 48° 35' 1" Oeste, Altitude: 740m). e Botucatu-SP (22° 53' 25" Sul, 48° 27'19" Oeste, Altitude: 828m), ambas classificadas como subtropical úmido, onde foram selecionados 10 animais que originaram 20 amostras para análise, esses animais apresentavam casos recorrentes da doença.

4.2. Amostras e critérios de inclusão no estudo:

Para a realização do estudo foram questionados aos produtores quais animais apresentavam quadros recorrentes da doença, logo, esses animais se encontravam apartados em lotes diferentes para o tratamento adequado, tendo em vista que as propriedades em questão são de alto teto produtivo.

Em seguida, os animais foram apartados no brete de contenção onde realizou-se a ordenha manual: desprezando os três primeiros jatos de leite, e coletando cerca de 10ml de leite de cada teto, as amostras foram coletadas utilizando frascos estéreis, identificados e acondicionados sob refrigeração (4-8°C) em caixas isotérmicas até o Laboratório de Microbiologia do Campus Lagoa do Sino, no dia 30 de maio de 2019, onde foram identificadas e processadas.

O isolamento bacteriano se deu por meio da semeadura de 50µL leite em ágar *Müller Hinton* e *MacConkey* e incubados aerobicamente por até 72h, realizando a leitura com 24h, 48h e 72h identificando características morfológicas e bioquímicas (DRESCHER, et al., 2010)

A partir desta identificação, realizou-se testes bioquímicos, como: fermentação da lactose, produção de indol, reações de vermelho de metila e Voges-Proskauer, utilização de citrato, produção de urease e produção de gás sulfídrico (H₂S). para identificar o gênero e espécie das bactérias em questão, com confiabilidade de até 90%. A realização dos testes bioquímicos se deu por meio do uso dos testes BACTRAY.

Após a identificação das bactérias, a colônias foram diluídas utilizando água destilada ao atingir o equivalente à escala 0,5 McFarland (1,5 x 10⁸ UFC/mL). Logo após inoculadas em toda superfície da placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton, em seguida foram adicionados discos de antimicrobianos conhecidos, foram selecionados 6 para o estudo, sendo eles: Gentamicina 120µg, Amoxicilina + Ácido Clavulânico 20/10µg, Sulfazotrim 25µg, Ciprofloxacina 5µg, Azitromicina 15µg e Tetraciclina 30µg, e incubados por 36 horas a 37°C. Após a incubação, observou-se os halos de inibição pelo método do manual *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2007)*. Como pode-se observar na imagem a seguir:

Figura 1: Placa para leitura dos halos



Fonte: Próprio autor, (2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Amplificando os resultados do estudo realizado em 2019, as amostras apresentaram isolados pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, e *Salmonella* spp., pode-se dizer que a ausência de sinais clínicos é bastante comum, já que mastites ocasionadas por bactérias dessa família não apresentam geralmente evidências clínicas, considerando um importante indicativo de mastite subclínica. Dentre os principais agentes ambientais *Escherichia Coli*, pode apresentar quadros severos da doença, que descobertos tardiamente podem levar até a morte do animal (PRESTES; FILATI; CECIM, 2003).

Analisando mais detalhadamente os resultados, podemos observar as tabelas a seguir:

Tabela 4: Identificação de bactérias e porcentagem de resistência de ovelhas com mastite sub-clínica submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos

Resultados resistência aos antimicrobianos					
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Salmonella</i> ssp.		Total avaliado
Amostras identificadas	11		9		20
	Resistência	Sensibilidade <i>E.coli</i>	Resistência	Sensibilidade <i>Salmonella</i>	
SUT	10 (90,90%)	1 (9,09%) 2	9 (100%)	0 (0%)	20
AMC	9 (81,82%)	(18,18%) 6	9 (100%)	0 (0%)	20
TET	5 (45,46%)	(54,54%) 8	7 (77,8%)	2 (22,2%)	20
GEN	3 (27,28%)	(72,72%) 5	1 (11,2%)	8 (88,8%)	20
CIP	6 (54,55)	(45,45%) 2	2 (22,3%)	7 (77,7)	20
AZI	9 (81,82%)	(18,18%)	8 (88,9%)	1 (11,1%)	20

SUT: sulfazotrim AMC: amoxiciclina + ácido clavulônico; TET: tetraciclina GEN: gentamicina; CIP: ciproflaxacin; AZI: azitromicina

O número reduzido de isolados, não permitiu avaliar com precisão o impacto causado pelos antimicrobianos, porém, observou-se que apenas dois animais apresentaram as duas bactérias em ambos tetos, ressaltando que cada teto do animal é independente fisiologicamente, como observado na tabela a seguir, a resistência de cada animal a um ou mais antimicrobianos:

Tabela 5: Resultados obtidos a partir da bateria de exames das amostras analisadas:

Perfil de resistência de bactérias aos antimicrobianos conhecidos e sua susceptibilidade					
Animal	Raça	Teto	Bactéria	Resistência	Susceptibilidade
1	Dorper	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
1	Dorper	esquerdo	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC; AZI; CIP; GEN	-
2	Dorper	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; AZI	TET; AMC; GEN; CIP
2	Dorper	esquerdo	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; AMC; AZI	CIP; GEN; TET
3	Ile de France	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; AMC; AZI; CIP	GEN
3	Ile de France	esquerdo	<i>Escherichia coli</i>	SUT; CIP; AMC; AZI	GEN; TET
4	Dorper	direito	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; CIP; AMC; AZI; TET	GEN
4	Dorper	esquerdo	<i>Escherichia coli</i>	SUT; CIP; AMC; GEN; AMC	TET
5	Dorper	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
5	Dorper	esquerdo	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
6	Sullfok	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
6	Sullfok	esquerdo	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC; AZI; GEN	CIP
7	Dorper	direito	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC	AZI; GEN; CIP
7	Dorper	esquerdo	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
8	Ile de France	direito	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC; AZI	GEN; CIP
8	Ile de France	esquerdo	<i>Escherichia coli</i>	SUT; CIP	TET; AMC; GEN; AZI
9	Ile de France	direito	<i>Escherichia coli</i>	SUT; CIP; AMC; AZI	TET; GEN
9	Ile de France	esquerdo	<i>Escherichia coli</i>	SUT; TET; GEN; AMC; AZI	CIP
10	Dorper	direito	<i>Salmonella ssp.</i>	SUT; TET; AMC; AZI	CIP; GEN

10 Dorper esquerdo *Salmonella* ssp. SUT;AMC;A CIP; GEN;
ZI TET

(GEN: Gentamicina; TET: Tetraciclina; AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulânico; CIP: Ciproflaxacina; SUT: Sulfazotrin; AZI: Azitromicina)

Observou-se que os animais apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano, o que caracteriza resistência múltipla, um fator considerável já que as opções de terapêutica são limitadas (CAVALCANTE et al, 2013).

Estudos realizados com produtos homeopáticos e extratos de plantas podem auxiliar juntamente com métodos tradicionais para o tratamento da doença, como por exemplo unguentos, pomadas, extratos vegetais, e óleos, aliados aos antimicrobianos tradicionais.

Com o aumento de casos de resistência justifica-se a necessidade mais dados a fim de caracterizar o mecanismo genético apresentado por essas bactérias, uma vez que um dos fatores de cepas resistentes é a capacidade do microrganismo em adquirir e transferir seus genes exógenos (ALVES, 2018).

Em bovinos leiteiros a infecção por espécies de *Salmonella* ssp. são normais. Geralmente é originada a partir da excreção de fezes contaminando o leite. Já em ovinos essas infecções são oriundas de ingestão de microrganismos infectados, e evacuações de animais que possuem a bactéria (ALVES; CHAPAVAL; PINHEIRO, 2006)

A *Salmonella* ssp. em ovinos ocasiona uma doença chamada Salmonelose causando abortos na espécie, sendo considerada altamente contagiosa (ALVES; CHAPAVAL; PINHEIRO, 2006). Desta forma, uma das hipóteses a ser considerada é que alguns animais estavam acometidos com esta doença, sendo aconselhado o descarte dos mesmos, pois a profilaxia empregada para o tratamento da mastite pode não ser adequada a mesma enfermidade. Apesar de ambas serem enterobactérias, a *Salmonella* apresentou um perfil de resistência mais agressivo em relação a *Escherichia Coli*, que provoca mastite.

Vários outros fatores podem influenciar a infecção, tendo em vista os microrganismos que habitam a orofaringe das matrizes e são transmitidos a orofaringe dos animais neonatos no ato de lambadura da matriz (SANTANA et al, 2016). A baixa imunidade da matriz no período do puerpério, fatores anatômicos, (úberes pendulares ou com tetos deslocados muito lateralmente e medialmente), possui uma susceptibilidade maior a doença, pois dificultam a mamada do cordeiro, e ficam

propensas a contaminação ambiental pelo grupo de coliformes como encontrado no caso a *Escherichia Coli*, sendo oportunista, apresentando um quadro de curta duração nos animais (cerca de 7 a 30 dias) (SANTANA et al, 2016).

A falta de produtos destinados ao tratamento da doença em pequenos ruminantes como caprinos e ovinos ainda é grande, assim muitos criadores utilizam drogas destinadas ao tratamento em bovinos, e em doses que não são adequadas, deixando os animais mais propensos à resistência. Porém como o número reduzido de amostras foi processado não se pode considerar um resultado significativo, do ponto de vista estatístico.

Medidas profiláticas relacionadas a higiene no manejo da ordenha como o emprego de pré e pós-dipping, além do uso de desinfetantes nos alojamentos onde os animais são manejados, são muito importantes, tendo em vista que essa prática auxilia e muito a obtenção do produto final, independentemente da finalidade da produção seja ela para carne, leite ou lã a mastite se apresenta como uma séria doença, pois a qualidade do leite de animais lactantes afeta o ganho de peso de animais novos, influenciando no ganho de peso diretamente.

Também é muito importante na produção leiteira tendo em vista a produção de queijos, as características microbiológicas e a segurança alimentar do consumidor final, que a cada ano que passa encontra-se cada vez mais exigente quanto a consumo de produtos de linha *gourmet* (CALLEFE; LANGONI, 2015).

5.1 Terapias alternativas no tratamento

Com a expansão da produção orgânica, surgiram outras estratégias para auxiliar o tratamento de mastite como por exemplo o emprego de homeopatia sendo uma alternativa pois apresentam uma facilidade na sua administração, baixo custo e toxicidade, não atua diretamente sobre o microrganismo, fazendo com que não haja interação medicamentosa e resistência microbiana (MANGIERI JUNIOR; BENITES; MELVILLE, 2015)

Os mesmos autores afirmam que o emprego da homeopatia apresenta sucesso em casos de mastite subclínica, e também ajuda a reduzir a reinfecção dos animais e auxilia no ganho de peso de cordeiros tratados com homeopatia, em comparação com os que foram administrados o placebo.

MORAIS *et al.*, 2011 afirmam que é necessário realizar o manejo adequado de limpeza e desinfecção na ordenha empregando o pré e pós-*dipping* a fim de reduzir a

incidência da doença. Já em animais que são destinados à produção de carne, faz-se necessário um acompanhamento constante para analisar a saúde do úbere.

Em um estudo realizado em Minas Gerais avaliou a atividade *in vitro* de extrato de ervas medicinais como: Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), aroeira (*Myracrodruon urundeuva*) e carqueja (*Baccharis thimera*) e os óleos da castanha de pequi (*Caryocar brasiliensis*), copaíba (*Copaifera landesdorffii*) e alecrim-pimenta (*Lippia origanoides*), onde o extrato de barbatimão e o alecrim-pimenta apresentaram uma eficácia em relação à mastite. Pode-se destacar o alecrim-pimenta pois além de apresentar ação antimicrobiana na mastite, ainda apresentou efeito microbicida quase que instantaneamente, podendo ser uma boa alternativa no tratamento em campo (SOUZA *et al.*, 2017).

6. CONCLUSÃO

A terapêutica utilizada apresenta problemas relacionados à resistência múltipla e/ou cruzada das espécies bacterianas identificadas.

Os antimicrobianos que apresentaram melhores resultados de inibição foram gentamicina e a tetraciclina. Assim, são necessárias novas alternativas quanto ao uso de antimicrobianos para o controle da mastite nos rebanhos ovinos como, por exemplo, o emprego de extratos e óleos vegetais juntamente com o tratamento convencional.

7. REFERÊNCIAS

ARAÚJO, Marina Rios de; COSTA, Mirella Carvalho; ECCO, Roselene. Ocorrência de pneumonia associada à infecção por *Mannheimia haemolytica* em ovinos de Minas Gerais. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 719-724, 2009.

BERRIATUA, E.; ZILUAGA, I.; MIGUEL-VIRTO, C.; URIBARREN, P.; JUSTE, R.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R. **Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection.** *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, p.990-994, 2001.

CALLEFE, J. L. R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. *Veterinária e Zootecnia*, v. 22, n. 2, jun. 2015. p. 151-162.

CONTRERAS, A. et al., **THE ROLE OF INTRAMAMMARY PATHOGENS IN DAIRY GOATS.** *Livestock Production Science*, v. 79, p. 273-283, 2003.

DRESCHER, G. et al. **CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DE AGENTES BACTERIANOS ISOLADOS DE MASTITE SUBCLÍNICA OVINA NA REGIÃO OESTE DE SANTA CATARINA.** 2010.

DE MORAIS, Greicielle et al. **CARACTERIZAÇÃO DA MASTITE OVINA NO NORTE DE MINAS GERAIS: OCORRÊNCIA, ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA.** *Revista Caatinga*, v. 24, n. 4, p. 164-171, 2011.

DOMINGUES, P. F.; LEITE, C. A. **MASTITE EM OVINOS.** 2014. Disponível em: <<http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/MastiteEmOvinos.pdf>>.

LUCHEIS, S. B; HERNANDES, G. S; TRONCARELLI, M. Z. **MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO DA MASTITE OVINA NA REGIÃO DE BAURU, SP.** 2010

MADRUGA, Andressa Miranda. **Uma análise da produção de leite ovino.** 2018.

MANGIERI JUNIOR, Roberto; BENITES, Nilson Roberti; MELVILLE, Priscilla Anne. Avaliação de tratamento homeopático na mastite ovina subclínica. **Veterinária e Zootecnia**, v. 22, n. 3, p. 455-464, 2015.

PEIXOTO, Rodolfo de M. et al. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 735-740, 2010.

PEIXOTO, R. M.; MOTA, R. ; COSTA, M.M. . **Mastite em pequenos ruminantes no Brasil.** 2010

ROHENKOHL, Júlio Eduardo *et al.* **O agronegócio de leite de ovinos e caprinos.** 2011. Disponível em: <https://revistas.dee.sp.gov.br/index.php/indicadores/article/view/2510/2975>. Acesso em: 25 abr. 2022.

SILVEIRA, Roberta Farias *et al.* **Leite ovino no Brasil: Uma revisão.** 2017. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63653009014>. Acesso em: 10 mar. 2023.

SPERONI, Gabriela; DOS SANTOS, Eduarda Nunes; CEZAR, Alfredo Skrebsky. AGENTES ETIOLÓGICOS MAIS COMUMENTE ENVOLVIDOS NA MASTITE OVINA-UMA REVISÃO. **Salão do Conhecimento**, v. 7, n. 7, 2021.

SANTOS, Fernanda Ferreira dos *et al.* Sistema agroindustrial do leite de ovelha no Brasil: aplicação do enfoque de “cadeias agroalimentares curtas”. Inovação, Gestão e Sustentabilidade 2. Tradução . Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. . Disponível em: <http://dx.doi.org/10.22533/at.ed.05419180618>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SOUZA, Cintya Neves *et al.* Atividade antimicrobiana de plantas medicinais do cerrado mineiro frente a bactérias isoladas de ovinos com mastite. **Unimontes Científica**, 2017.

VERÍSSIMO, Cecília José; MARTINS, Katheryne Benini; ZAFALON, Luiz Francisco. Mastite ovina: mortalidade de cordeiros. 2009.

ZAFALON, L. F. *et al.* Estafilococos resistentes à oxacilina isolados em casos de mastite subclínica em ovinos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, p. 1-7, 2012.