



ANTONIO CARLOS MARCONDES DE CARVALHO NETO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO NO
LABORATÓRIO DE ANÁLISES DO LEITE DA EMPRESA
CIA. DO LEITE COM ÊNFASE NA IDENTIFICAÇÃO DE
PATÓGENOS CAUSADORES DA MASTITE**

LAVRAS – MG

2021

ANTONIO CARLOS MARCONDES DE CARVALHO NETO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO NO LABORATÓRIO DE
ANÁLISES DO LEITE DA EMPRESA CIA. DO LEITE COM ÊNFASE NA
IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS CAUSADORES DA MASTITE**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Medicina Veterinária, para a
obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Christian Hirsch

Orientador

LAVRAS – MG

2021

ANTONIO CARLOS MARCONDES DE CARVALHO NETO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO NO LABORATÓRIO DE
ANÁLISES DO LEITE DA EMPRESA CIA. DO LEITE COM ÊNFASE NA
IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS CAUSADORES DA MASTITE**

**SUPERVISED INTERNSHIP REPORT IN THE MILK ANALYSIS
LABORATORY OF THE COMPANY CIA. DO LEITE WITH EMPHASIS ON
THE IDENTIFICATION OF MASTITIS CAUSING PATHOGENS**

Relatório de estágio supervisionado
apresentado à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do
Curso de Medicina Veterinária, para a
obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 29 de novembro de 2021

Prof. Dr. Hugo Shisei Toma UFLA

Mestranda Amanda Veríssimo Rezende UFLA

Prof. Dr. Christian Hirsch

Orientador

LAVRAS – MG

2021

Aos meus pais, avós e meu irmão por todo o apoio nessa jornada até aqui, em todos os momentos bons e ruins.

Ao meu falecido avô, Antonio Carlos, desejava que visse esse momento.

Dedico a vocês esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a meus pais Antonio e Andrea, minha base e exemplo para toda a vida, a vocês devo tudo que sou e serei. Obrigado pelo apoio e amor incondicional e todos os sacrifícios que fizeram para que eu chegasse a esse momento, a vocês digo que essa hora finalmente chegou. Ao meu irmão Gabriel, meu primeiro e maior amigo de todas as horas, mesmo distantes pelas circunstâncias, sempre próximos. A você o meu mais sincero obrigado pelos conselhos em horas difíceis onde sempre manteve a calma e pelos bons momentos e risadas. Aos meus avós, Antonio Carlos, Mary, Félix e Maria Aparecida, que tanto esperaram por esse momento. Seu apoio, conselhos e amor que só avós sabem oferecer tornaram essa jornada menos tortuosa e muito mais fácil. Minha família, a vocês sou grato por tudo!

A minha namorada, Stefani, por estar presente nestes momentos tensos e finais, sem sua ajuda, apoio e carinho eu não sei se isso seria possível. Obrigado pelos bons dias ao meu lado, porém principalmente pelos piores, quando mais precisei.

Aos meus amigos e colegas, vindos dos lugares mais inesperados e companheiros do NECC, em especial a Amanda, Ândria, Flávio, Guilherme G., Guilherme H. e Vinícius. Vocês tornaram todos esses em uma longa e estranha, porém divertida, jornada!

Agradeço a todos os professores que tive em todos esses anos, da mais tenra juventude até esse momento. Em especial ao meu orientador, Christian Hirsch, pela paciência, conselhos e confiança, além de todo o conhecimento a mim passado.

Finalmente, agradeço à equipe da Cia. do Leite pela oportunidade e os conhecimentos compartilhados.

“Será glorioso, vencendo ou não.”

Neil Gaiman

RESUMO

Este trabalho descreve o estágio supervisionado realizado no Laboratório de Análises Microbiológicas do leite da empresa Cia. do Leite, compreendido no período de 10 de agosto a 19 de novembro de 2021, totalizando 408 horas de atividades práticas correspondentes à disciplina PRG107 do último período do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob orientação do Prof. Dr. Christian Hirsch, da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da UFLA (FZMV – UFLA). Durante o período de estágio foram realizadas culturas microbiológicas de 1367 amostras de leite, com a identificação de 946 microrganismos de 18 espécies segundo metodologia recomendada pelo *National Mastitis Council* (NMC), para rastreio de ditos microrganismos causadores de mastite em rebanhos atendidos pela Cia. Do Leite e de produtores particulares, com o intuito de proporcionar tratamento eficaz da afecção e diminuição efetiva da Contagem de Células Somáticas (CCS) e da Contagem Bacteriana Total (CBT), contribuindo diretamente para a qualidade do leite, bem estar animal e lucratividade da propriedade. Em menor escala, foram analisadas amostras de leite advindas de tanque de expansão, 11 destas, com o intuito de rastreio de patógenos causadores de mastite contagiosa na propriedade e também antibiogramas de 25 amostras bacterianas, buscando o tratamento mais eficiente para os patógenos causadores de infecções intramamárias, estas seguindo as orientações do NMC e do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Palavras-chave: Estágio supervisionado. Mastite. Cultura microbiológica. Leite. Microbiologia.

ABSTRACT

This work describes the supervised internship carried out at the Laboratory of Microbiological Analysis of Milk of the company Cia. do Leite, from August 10 to November 19, 2021, totaling 408 hours of practical activities corresponding to subject PRG107 of the last period of the course. Veterinary Medicine at the Federal University of Lavras (UFLA), under the supervision of Prof. Dr. Christian Hirsch, from the Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine at UFLA (FZMV – UFLA). During the internship period, microbiological cultures of 1367 milk samples were carried out, with the identification of 946 microorganisms of 18 species according to the methodology recommended by the National Mastitis Council (NMC), to screen said microorganisms that cause mastitis in herds served by Cia. Do Leite and from private producers, in order to provide effective treatment of the condition, with effective reduction of the Somatic Cell Count (SCC) and Total Bacterial Count (TBC), directly contributing to the quality of milk, animal welfare and profitability of the property. On a smaller scale, bulk tank samples were analyzed, 11 of them, in order to screen for pathogens causing contagious mastitis on the property and also antibiograms from 25 bacterial samples, seeking the most efficient treatment for the pathogen causing intramammary infection, these following the guidelines of the NMC and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Keywords: Supervised internship. Mastitis. Microbiological culture. Milk. Microbiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sede da empresa Cia. do Leite.....	10
Figura 2 - Estrutura interna do Laboratório de Análises Microbiológicas do Leite da Cia. do Leite.....	11
Figura 3 - Estufa para incubação de microrganismos do Laboratório Cia. do Leite.....	12
Figura 4 - Fluxograma de identificação do gênero <i>Staphylococcus</i> spp.	22
Figura 5 - Fluxograma de identificação dos gêneros <i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i>	22
Figura 6 - Fluxograma de identificação de microrganismos Gram negativos.....	23
Figura 7 – Amostras de leite higienizadas e dispostas em bancada, prontas para inoculação em meio de cultura.....	25
Figura 8 - Placa de ágar sangue dividida e demarcada com o código de identificação de 8 amostras.	26
Figura 9 - Crescimento de colônias translúcidas no meio ágar sangue em leitura de 24h.	27
Figura 10 - Crescimento de diversas colônias por amostra, denotando contaminação. .	27
Figura 11 - Imagens de microscopia óptica de diferentes microrganismos/morfologias em aumento de 100x.....	29
Figura 12 - Reação positiva no teste de catalase.	30
Figura 13 - Ágar Sal Manitol após 24 horas de incubação. É possível visualizar resultados positivos (amarelo) e negativos (rosa).....	32
Figura 14 - Ágar MacConkey após incubação. É possível visualizar colônias fermentadoras de lactose (rosa), não fermentadoras (marrom claro) e <i>Serratia</i> spp. (vermelhas).	33
Figura 15 - Reação de CAMP positiva, identificando <i>S. agalactiae</i>	35
Figura 16 - Prova de coagulase negativa (acima) e positiva (abaixo).	36
Figura 17 - Meio MIO apresentando motilidade, indol e ornitina positivos (esquerda) e negativos (direita).	38
Figura 18 - Ágar Citrato de Simmons negativo (verde) e positivo (azul).	39
Figura 19 - Teste de Oxidase em tira positivo (acima) e negativo (abaixo).....	40
Figura 20 - Prova de Bile Esculina positiva.	41
Figura 21 - Prova de PYR negativa.	42
Figura 22 - Exemplo de laudo de cultura microbiológica.	43

Figura 23 - Ágar Vogel - Johnson utilizado para análise de perfil microbiológico de tanque.....	46
Figura 24 - Ágar MacConkey utilizado para análise de perfil microbiológico de tanque.	47
Figura 25- Colônias de <i>S. agalactiae</i> em meio cromogênico Strepto B.	48
Figura 26 - Antibiograma em ágar Müller - Hinton Sangue.....	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Total de cada exame realizado no período de estágio supervisionado.....	13
Gráfico 2 – Número de amostras processadas a cada mês.	14
Gráfico 3 – Estados de origem das amostras.....	14
Gráfico 4 - Resultados preliminares das culturas.	15
Gráfico 5 - Número de agentes causadores de mastite contagiosa e ambiental identificados.....	16
Gráfico 6 – Espécies de microrganismos identificadas durante o período de estágio....	17
Gráfico 7 - Presença de microrganismos causadores de mastite contagiosa em amostras de tanque.....	17
Gráfico 8 - Número de microrganismos por espécie que foram submetidos ao antibiograma.	18
Gráfico 9 - Susceptibilidade dos isolados de <i>S. aureus</i> aos diferentes antibióticos utilizados.....	19
Gráfico 10 - Susceptibilidade dos isolados de <i>Staphylococcus coagulase negativos</i> aos antibióticos utilizados.	19
Gráfico 11 - Susceptibilidade dos isolados de <i>S. agalactiae</i> aos antibióticos utilizados.	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados esperados dos testes para a identificação de Gram Negativos da família <i>Enterobacteriaceae</i>	39
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO	10
2.1 O Laboratório	11
2.1.1 Da estrutura física do laboratório	12
3 CASUÍSTICA	13
4 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS	20
4.1 Rotina de cultura microbiológica do leite	21
4.1.1 Recomendações para coleta e remessa de amostras de leite para cultura microbiológica	23
4.1.2 Recepção, identificação e plaqueamento de amostras de leite	24
4.1.3 Leitura de crescimento de colônias	26
4.1.4 Identificação morfológica dos microrganismos e teste de catalase	28
4.1.4.1 Microrganismos de identificação morfológica direta	30
4.1.5 Meios de cultura específicos	31
4.1.5.1 Ágar Sal Manitol – Estafilococos	31
4.1.5.2 Ágar MacConkey – Gram Negativos	32
4.1.5.3 Ágar CAMP Esculina – Estreptococos	33
4.1.6 Provas confirmatórias	35
4.1.6.1 Prova de Coagulase	35
4.1.6.2 Meio MIO	36
4.1.6.3 Citrato de Simmons	38
4.1.6.4 Teste de Oxidase	40
4.1.6.5 Prova de Bile Esculina	41
4.1.6.6 Prova de PYR	42
4.1.7 Confeção e emissão de laudos	43
4.2 Cultura de amostras de tanque de expansão	44
4.2.1 Descrição do método utilizado	44
4.2.2 Ágar Vogel – Johnson	45
4.2.3 Ágar MacConkey	46
4.2.4 Meio Cromogênico Strepto B	47
4.3 Antibiograma	48
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
6 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1 INTRODUÇÃO

O curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras (UFLA) é composto por dez semestres, sendo nove dedicados às disciplinas obrigatórias e eletivas intrínsecas à graduação e o último sendo destinado à disciplina PRG 107 – Estágio supervisionado, com 28 créditos, sendo 408 horas de atividades práticas e 68 horas de atividades teóricas utilizadas na confecção do presente trabalho. Dentro dos demais nove períodos da graduação, além das disciplinas obrigatórias e eletivas, atividades extracurriculares extremamente necessárias para a formação profissional são desenvolvidas, das quais abrangem um vasto leque, com os mais diversos focos e escopos, compreendendo atividades vivenciais no hospital e laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), participação em núcleos de estudo, projetos de iniciação científica, projetos de extensão, monitorias, eventos e inúmeras possibilidades mais.

O estágio supervisionado, além de uma exigência para a conclusão do curso, é uma oportunidade para crescimento pessoal e profissional sem comparação, sendo possível a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos durante toda a graduação. Possibilita vislumbrar sua área de atuação escolhida, porém também expandir os horizontes para outras áreas muitas vezes ainda não contempladas pelo estudante.

A Cia. do Leite é uma empresa de soluções técnicas e gerenciais para o agronegócio da bovinocultura leiteira fundada em 2014, dispondo de notoriedade no mercado leiteiro em âmbito nacional. Seus projetos englobam a melhoria geral do sistema de produção, acarretando em maior volume e qualidade do leite, e estes em sua maioria se enquadram dentro do Programa Mais Leite Saudável, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Dois seguimentos principais de trabalho se destacam: a Assistência Técnica e Gerencial e a Qualidade do leite, onde o Laboratório de Análises Microbiológicas do Leite se enquadra, identificando microrganismos causadores da mastite e realizando outras análises, como antibiogramas e culturas microbiológicas de tanques de expansão.

Dadas estas características e a grande oportunidade de crescimento pessoal e profissional representada, a Cia. Do Leite, e em especial seu laboratório, foi o local escolhido para a realização do estágio supervisionado. Este trabalho tem como objetivo descrever as atividades desenvolvidas durante o período de estágio, bem como apresentar uma apreciação crítica do trabalho realizado.

2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

A Cia. do Leite foi fundada no ano de 2014, inicialmente trabalhando no ramo varejista de comercialização de insumos para a atividade pecuária leiteira. Porém com o passar do tempo foi notada a crescente demanda por assistência técnica nas propriedades dedicadas à atividade, oportunidade então abraçada pela empresa, que desde então atua na área, com foco em nutrição, reprodução, melhoramento genético, gestão, sanidade animal e qualidade do leite.

Atualmente, a empresa atua levando soluções técnicas e gerenciais em toda a cadeia produtiva do leite, dos produtores de todo porte até as indústrias de laticínios e cooperativas, com sede na cidade de Lavras/MG, Rua José Maria Azevedo, 262, no bairro Jardim Fabiana (Figura 1). O programa Mais Leite Saudável, vinculado ao MAPA, representa grande parte do mercado da empresa, onde a mesma habilita e realiza projetos deste em parceria com os laticínios e cooperativas, porém também atende produtores na forma de convênios particulares. O objetivo de cada um destes projetos é a melhoria real do produtor e propriedade, aliando produtividade com qualidade no leite por ele enviado aos laticínios.

Figura 1 - Sede da empresa Cia. do Leite.



Fonte: Do autor (2021).

2.1 O Laboratório

O Laboratório da Cia. Do Leite nos moldes atuais foi fundado em 2017, sendo um importante braço do setor de qualidade do leite da empresa, proporcionando eficácia no diagnóstico e diminuição nos custos de tratamento das mastites nas propriedades atendidas, realizando assistência técnica para diminuição da Contagem de Células Somáticas (CCS) e dos valores de Contagem Bacteriana Total (CBT). Todo o seu procedimento padrão é baseado nas recomendações do *National Mastitis Council* (NMC).

O estágio foi realizado no Laboratório de Análises Microbiológicas do Leite da Cia. do Leite, na sede da empresa em Lavras/MG, Rua José Maria Azevedo, 262, Jardim Fabiana (Figura 2). Ocorrendo no período de 10 de agosto a 19 de novembro de 2021, totalizando 408 horas de atividades práticas realizadas sob supervisão do Médico Veterinário e diretor da empresa, Ronaldo Carvalho Macedo.

Figura 2 - Estrutura interna do Laboratório de Análises Microbiológicas do Leite da Cia. do Leite.



Fonte: Do autor (2021).

Ao final foram realizadas 1367 culturas microbiológicas de 78 produtores, advindas dos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná, onde foram isolados 18 microrganismos causadores de mastite contagiosa e ambiental, como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*

agalactiae, *Corynebacterium spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.* (coagulase negativos), *Streptococcus spp.* (ambientais), *Prototheca spp.*, dentre outros. Também sendo realizados 25 antibiogramas e 11 culturas de amostras compostas de tanques de resfriamento para rastreio de patógenos.

2.1.1 Da estrutura física do laboratório

O Laboratório de Análises Microbiológicas Cia. Do Leite é classificado como nível de biossegurança 2, trabalhando com microrganismos com potencial zoonótico e patogênico, como *S. aureus*, *Klebsiella spp.* e *Escherichia coli*. Conta com um escritório associado à recepção, área de estoque e o laboratório propriamente dito, com local separado para preparação e coloração de Gram de lâminas com esfregaços bacterianos e autoclavagem de instrumental.

Possui além disso uma capela de fluxo laminar, utilizada para produção de meios de cultura e placas de cultura na fazenda, estufa para incubação das placas de Petri inoculadas (Figura 3), microscópios para leitura de esfregaços, além de autoclave, kit para realização de coloração de Gram e freezers para armazenamento de amostras de leite congeladas.

Figura 3 - Estufa para incubação de microrganismos do Laboratório Cia. do Leite.



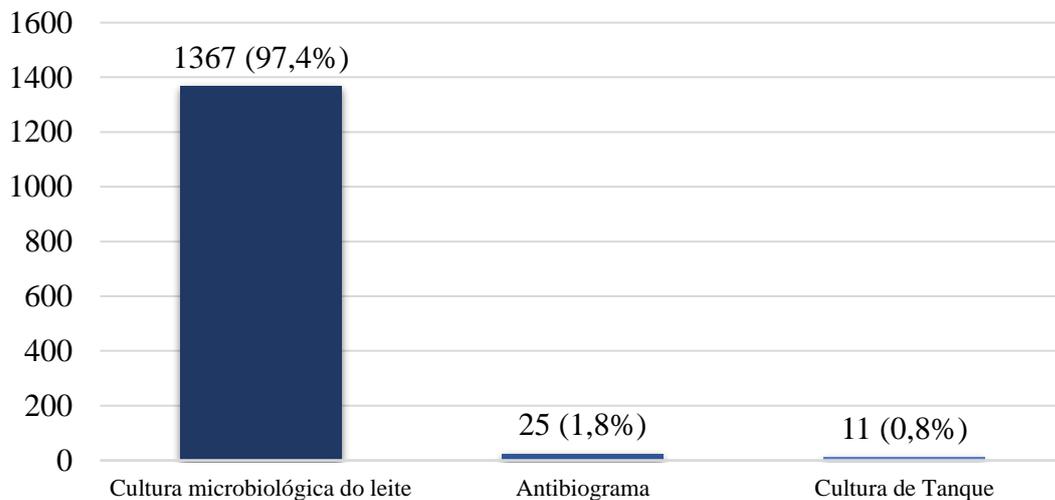
Fonte: Do autor (2021).

3 CASUÍSTICA

O número de exames realizados de cada tipo, número de exames realizados a cada mês, resultados das culturas microbiológicas, espécies encontradas, tipos de agentes causadores de mastite encontrados, número de amostras por estado e resultados das culturas de tanque e antibiogramas realizados no período de 10 de agosto a 19 de novembro de 2021 estão descritos nos gráficos de número 1 a 11, apresentados a seguir.

O Gráfico 1 demonstra a proporção de cada exame executado durante o período de estágio. A cultura microbiológica do leite foi o exame mais realizado, com 1367 amostras processadas, compondo 97,4% de toda a rotina diagnóstica acompanhada. Em comparação os antibiogramas representaram 1,8%, com 25 exames e a cultura de tanque sendo a menos realizada, representando 0,8% com 11 executadas.

Gráfico 1 – Total de cada exame realizado no período de estágio supervisionado.

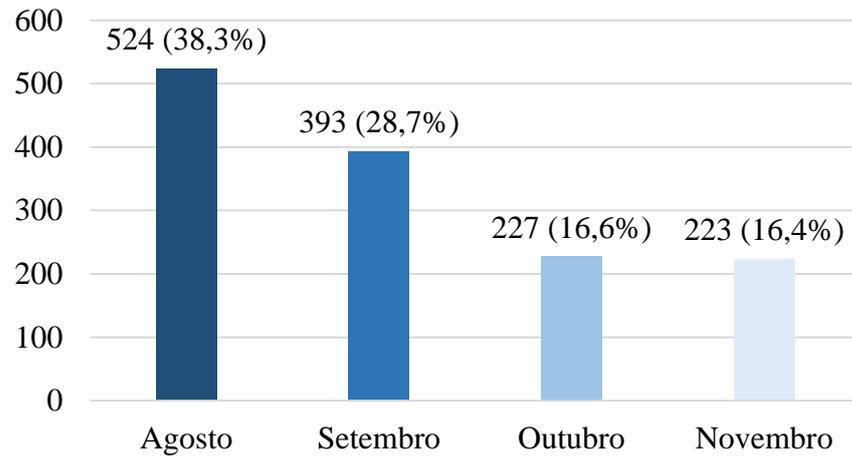


Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 2 mostra quantas amostras foram recebidas e processadas na rotina em busca de patógenos causadores de mastite. O mês de agosto correspondeu ao maior número de amostras processadas, representando 38,3% do total, o mês de setembro representou 28,7% e os meses com a menor quantidade sendo os de outubro, com 16,6% das amostras, e novembro, com 16,4% das amostras. Vale ressaltar que o mês de novembro tem resultados de apenas suas

duas primeiras semanas, não representando o espaço amostral completo do mês como os demais.

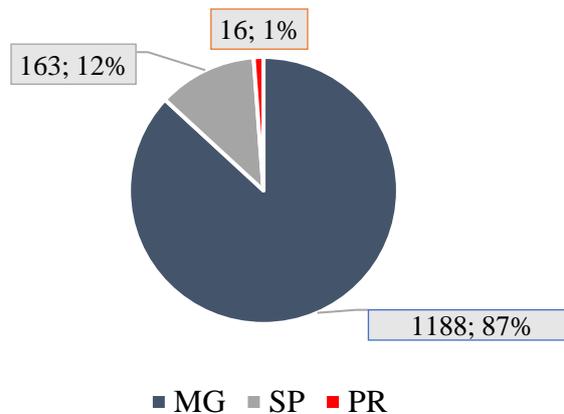
Gráfico 2 – Número de amostras processadas a cada mês.



Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 3 mostra os estados de origem das amostras recebidas para cultura microbiológica. A maior parte é oriunda do estado de Minas Gerais, representando 87% do total. O estado de São Paulo representa 12% das amostras analisadas e o estado do Paraná representa 1% destas, advindas de apenas um produtor.

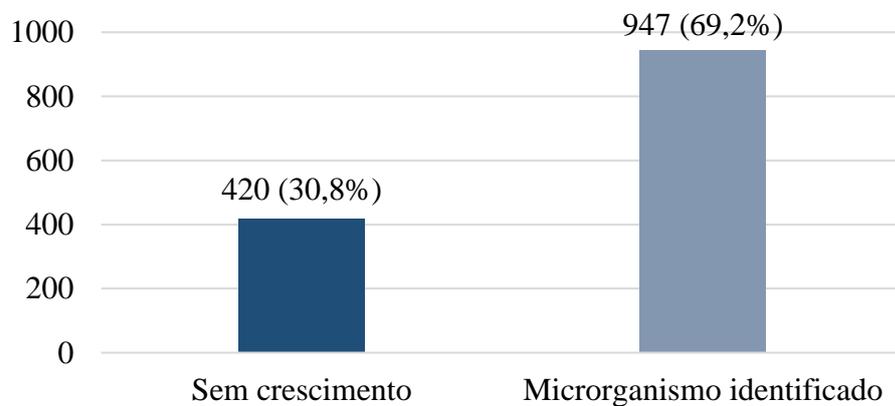
Gráfico 3 – Estados de origem das amostras.



Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 4 mostra quantas amostras não apresentaram crescimento de microrganismos e quantas apresentaram. Microrganismos foram encontrados em 69,2% dessas amostras, não apresentando crescimento microbiológico em 30,8% dos casos. É importante frisar que o resultado negativo de uma cultura implica na inexistência de mastite subclínica ou clínica no animal, podendo ocorrer no caso de microrganismos com liberação cíclica no leite, como *S. aureus*, UFC/ml insuficientes no leite para sua detecção, uso de antibióticos anteriormente a coleta da amostra e microrganismos não resistentes ao congelamento, caso seja realizado (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 1989).

Gráfico 4 - Resultados preliminares das culturas.

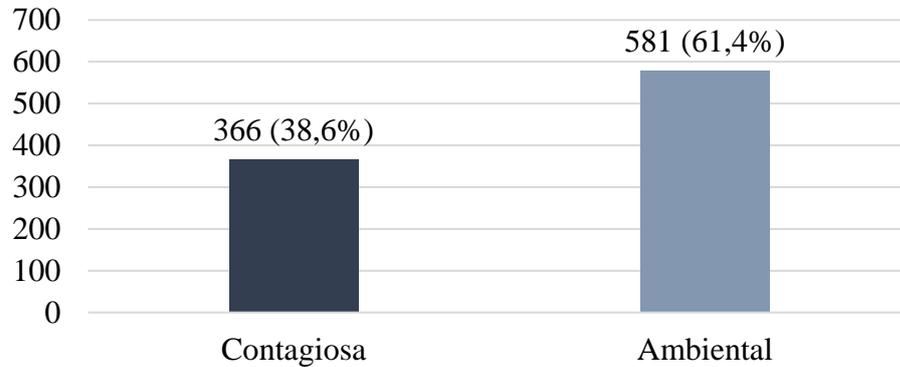


Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 5 mostra a categoria dos patógenos isolados em cultura. Os microrganismos causadores de mastite contagiosa representam 38,6%, compostos pelas espécies *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e o gênero *Corynebacterium spp.*, agrupados dessa forma segundo descrito por Santos e Fonseca em 2019. A mastite ambiental representou a maior porção dos microrganismos identificados, sendo 61,4% das amostras positivas para estes, os gêneros *Streptococcus spp.*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* *Staphylococcus coagulase negativos*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Hafnia spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Prototheca spp.* e Leveduras, agrupados segundo a classificação de Santos e Fonseca em 2019 e pelo *National Mastitis Council* em 2017. A prevalência de agentes ambientais evidencia principalmente má higiene de ordenha e do ambiente que o animal é mantido e ausência ou realização incorreta de pré-dipping (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019). Isso também pode ser associado pela maior parte do estágio supervisionado ser realizado durante o período chuvoso, onde segundo Santos e Fonseca (2019) há um aumento das

infecções intramamárias do tipo ambiental, os quais representaram a maior parte dos isolados nos meses de outubro e novembro de 2021 no Laboratório Cia. Do Leite.

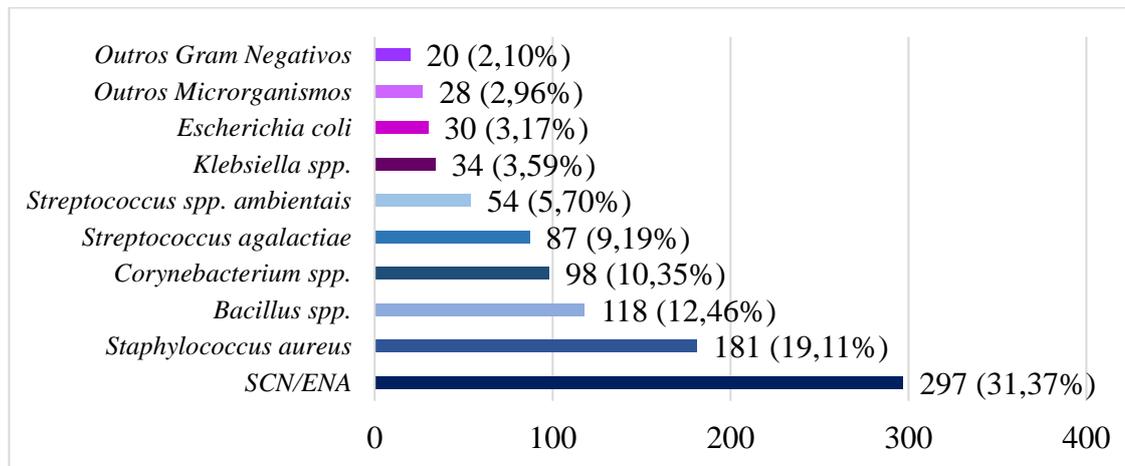
Gráfico 5 - Número de agentes causadores de mastite contagiosa e ambiental identificados.



Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 6 exibe a quantidade de microrganismos de cada espécie, gênero ou grupo (caso dos *Streptococcus spp.* ambientais e dos *Staphylococcus coagulase negativos*). A classificação Outros Microrganismos compreende o gênero *Prototheca spp.* e Leveduras. Já a classificação Outros Gram Negativos abrange os gêneros *Serratia spp.*, *Hafnia spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Enterobacter spp.* e, por fim, os *Streptococcus spp.* ambientais abrangem as espécies *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *Enterococcus spp.* e o restante do gênero *Streptococcus spp.* identificados. Estas classificações foram feitas baseadas nas utilizadas por Santos e Fonseca em 2019 e pelo *National Mastitis Council* em 2017 de forma a facilitar a visualização das informações apresentadas no gráfico.

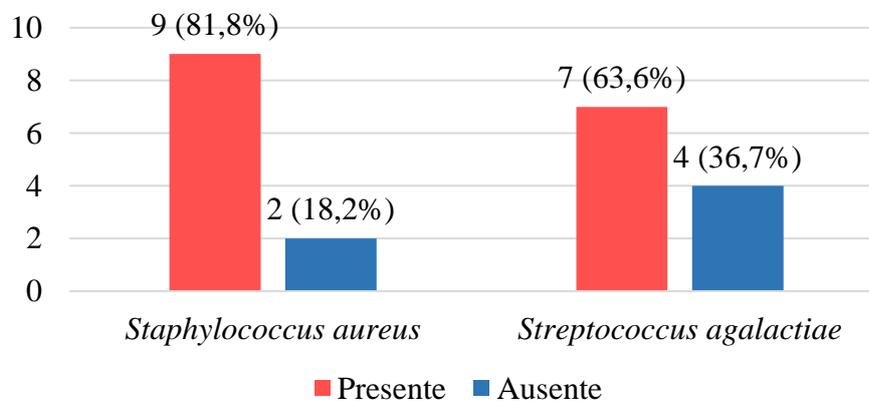
Gráfico 6 – Espécies de microrganismos identificadas durante o período de estágio.



Fonte: Do Autor (2021).

O Gráfico 7 mostra a presença dos patógenos causadores de mastite contagiosa *S. aureus* e *S. agalactiae* nos tanques de resfriamento de 11 propriedades que enviaram amostras para o laboratório. O *Staphylococcus aureus* estava presente em 81,8% das amostras analisadas, em comparação o *Streptococcus agalactiae* estava presente em 63,6% das mesmas. O recomendado é que não sejam encontrados nestas amostras, servindo então como uma forma de identificação de um rebanho positivo para estes agentes e sendo recomendado o rastreio dos agentes e identificação dos animais infectados para serem tomadas as medidas de contenção, como adoção de linha de ordenha, tratamento ou descarte destes animais (KEEFE, 2012; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2004, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

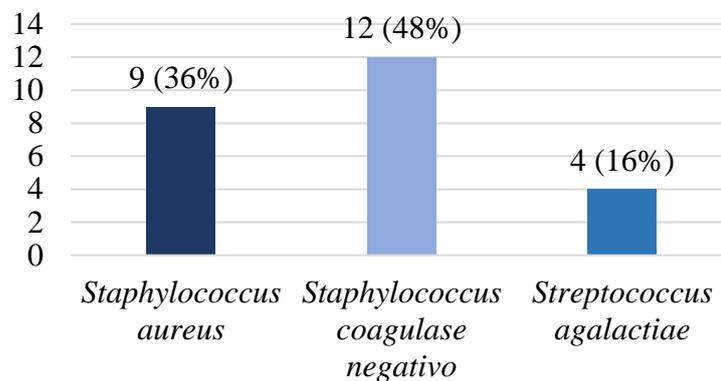
Gráfico 7 - Presença de microrganismos causadores de mastite contagiosa em amostras de tanque.



Fonte: Do Autor (2021).

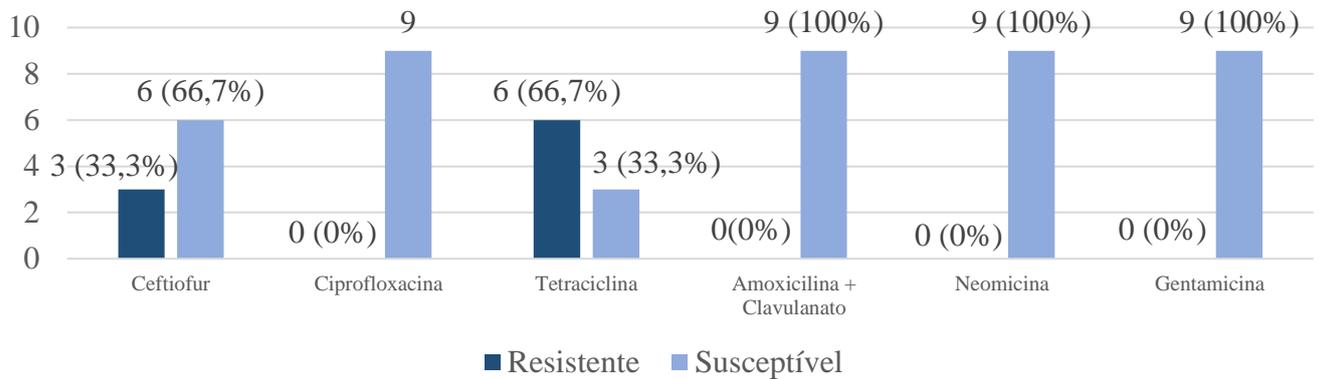
O Gráfico 8 mostra quantos microrganismos de cada espécie isolada em cultura foram submetidos ao exame de antibiograma. Os *Staphylococcus* coagulase negativos representaram 48% dos microrganismos examinados, seguidos pelo *Staphylococcus aureus* com 36% e, por fim, *Streptococcus agalactiae* representando 16% do total. Vale ressaltar que foi realizado o antibiograma de apenas 2,6% de todos os microrganismos identificados no laboratório.

Gráfico 8 - Número de microrganismos por espécie que foram submetidos ao antibiograma.

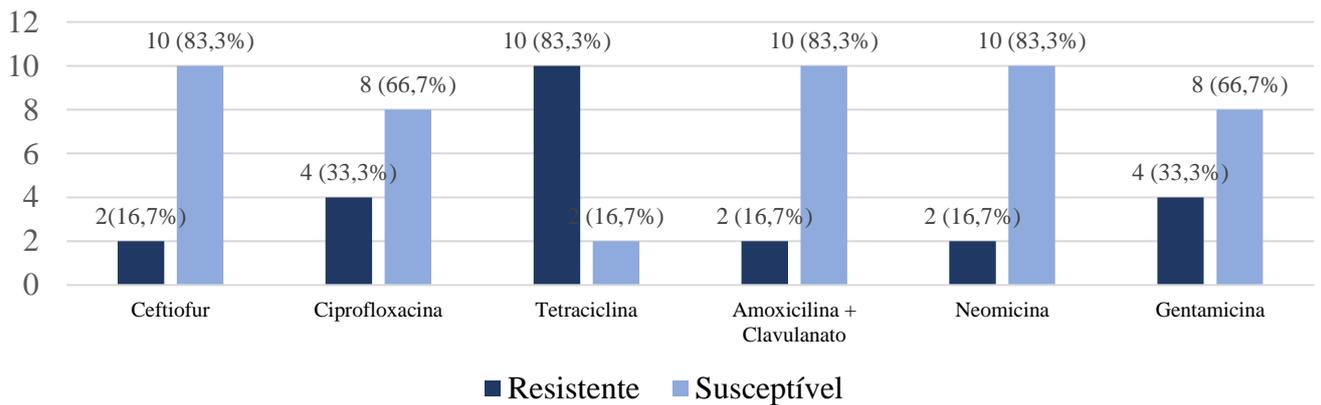


Fonte: Do Autor (2021).

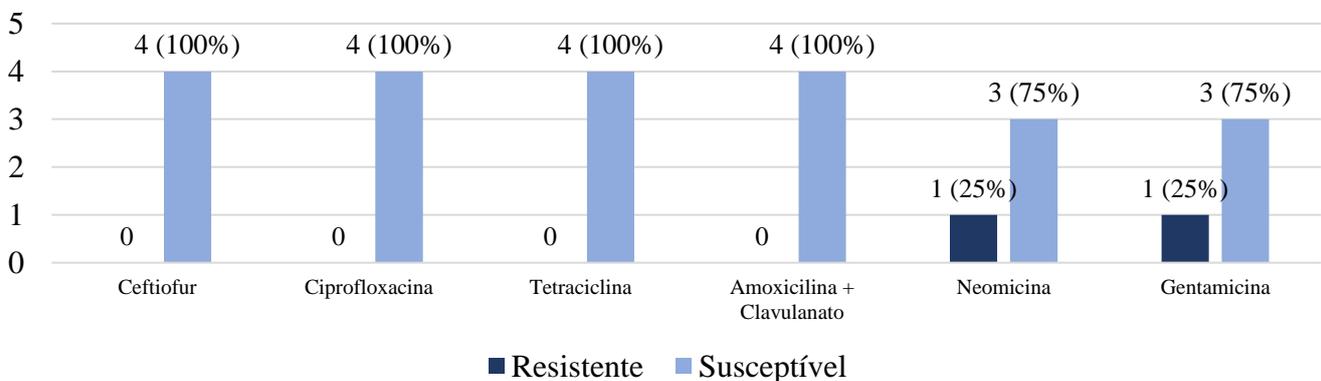
Os Gráficos de número 9 a 11 representam a susceptibilidade dos patógenos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae* aos antibióticos Cefotiofur, Ciprofloxacina, Tetraciclina, Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico, Neomicina e Gentamicina. Quanto à resistência bacteriana aos antibióticos 20% de todos os microrganismos apresentaram resistência ao Cefotiofur, 16% a Ciprofloxacina, 64% a Tetraciclina, 8% apresentaram resistência à associação Amoxicilina + Clavulanato, 12% a Neomicina e 20% foram resistentes a Gentamicina. As moléculas de uso comum e de maior presença em formulações comerciais para tratamento da mastite, de fácil acesso ao produtor, como Cefotiofur, Gentamicina e até mesmo a Tetraciclina foram os que apresentaram maior resistência bacteriana, porém o pequeno número amostral não permite inferir além disso.

Gráfico 9 - Susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* aos diferentes antibióticos utilizados.

Fonte: Do Autor (2021).

Gráfico 10 - Susceptibilidade dos isolados de *Staphylococcus coagulase* negativos aos antibióticos utilizados.

Fonte: Do Autor (2021).

Gráfico 11 - Susceptibilidade dos isolados de *S. agalactiae* aos antibióticos utilizados.

Fonte: Do Autor (2021).

4 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS

O enfoque principal deste estágio foi o acompanhamento da rotina de exames diagnósticos do laboratório, estando em primeiro lugar a identificação de patógenos causadores de mastite clínica e subclínica a partir de amostras de leite, estas sendo compostas ou isoladas. Secundariamente, outros exames foram acompanhados e realizados, como antibiogramas e culturas de amostras compostas de tanques de expansão, porém estes em menor volume. Todos os testes de identificação realizados são pautados nos exames preconizados pelo *National Mastitis Council*, sendo utilizado o padrão ouro para o diagnóstico de infecções intramamárias (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017)

A bovinocultura leiteira possui imensa importância socioeconômica no Brasil, sendo povoada por pequenos e médios produtores principalmente, e o país é o terceiro maior produtor de leite do mundo segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A mastite é a maior causa de perdas econômicas na atividade leiteira nacional e mundial, com perdas visíveis ou diretas, como descarte de leite de animais em tratamento e mastite clínica, o próprio ônus do tratamento e medidas de controle, morte de animais; e perdas indiretas ou invisíveis, como a redução na produção leiteira pela mastite subclínica e clínica, chegando a 5% ao fim da lactação, perda de bonificações de pagamento por alta CCS e CBT, descarte involuntário de animais, prejuízos na reprodução e no estado geral de bem estar do animal (GONÇALVES et al., 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

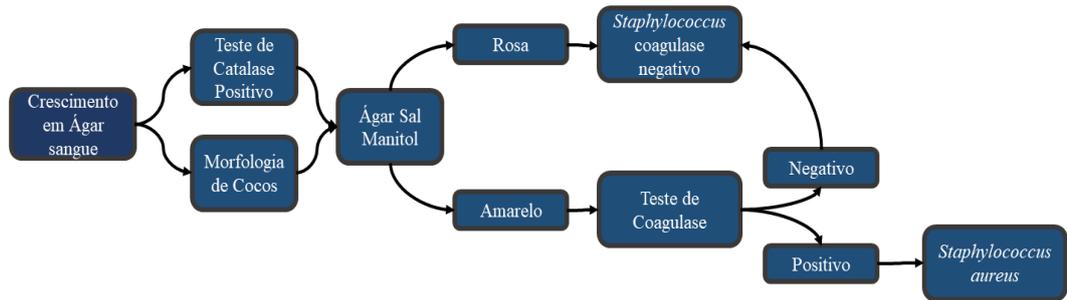
4.1 Rotina de cultura microbiológica do leite

A cultura microbiológica é considerada o padrão ouro para o diagnóstico de infecções intramamárias (IIM), sendo fundamental para a identificação do agente e mitigação dos prejuízos, guiando a escolha de medidas de controle e profilaxia corretas para cada tipo de mastite e o uso racional de antibióticos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Dentre as medidas que podem ser utilizadas estão a vacinação, antibioticoterapia, tratamento de vaca seca, adoção de linha de ordenha ou o próprio descarte direcionado à tentativa de eliminar algum agente de difícil tratamento, como o *Staphylococcus aureus* (BOTARO et al., 2015; KEEFE, 2012; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

A rotina de cultura microbiológica do Laboratório Cia. Do Leite respeita uma ordem semanal, e segue um procedimento operacional padrão de quatro etapas, cada qual com espaçamento de um dia. É iniciada na recepção e processamento das amostras, usando meios de triagem como o ágar sangue, seguido pela transferência de colônias para meios específicos e, por fim a realização de testes confirmatórios e a emissão dos laudos. Vale ressaltar que a recepção de amostras ocorre todos os dias, porém o processamento ocorrerá apenas nos dois primeiros dias da semana, congelando as recebidas fora destes para a semana seguinte, o procedimento geral se dá conforme o orientado pelo NMC e a literatura nacional vigente e o congelamento de amostras de leite por períodos menores que trinta dias não afeta significativamente a identificação dos patógenos (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 1989).

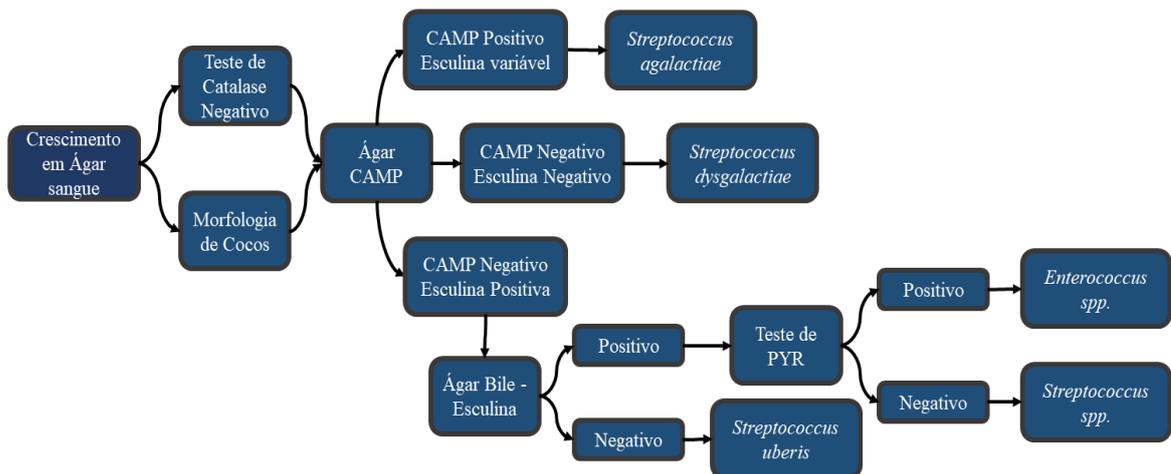
Os fluxogramas nas figuras de número 4 a 6 resumem o processo de identificação dos principais gêneros e espécies de microrganismos pelos métodos de isolamento utilizados pelo Laboratório de Análises Microbiológicas da Cia. Do Leite:

Figura 4 - Fluxograma de identificação do gênero *Staphylococcus spp.*



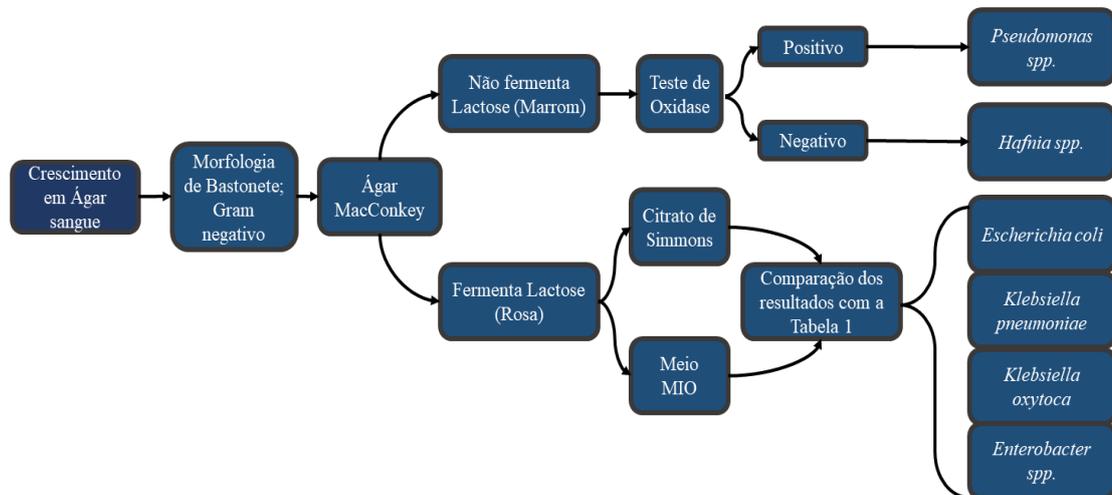
Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca (2019), *National Mastitis Council* (2017) e Simões et al (2013).

Figura 5 - Fluxograma de identificação dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*.



Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca (2019) e *National Mastitis Council* (2017).

Figura 6 - Fluxograma de identificação de microrganismos Gram negativos.



Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca (2019) e *National Mastitis Council* (2017).

4.1.1 Recomendações para coleta e remessa de amostras de leite para cultura microbiológica

A cultura microbiológica tem início na coleta das amostras de leite, e não apenas quando adentra no ambiente laboratorial, dessa forma é de suma importância o respeito das boas práticas tanto nessa fase quanto na remessa para a análise. O laboratório estagiado faz a recomendação baseada no consenso do *National Mastitis Council* e na literatura nacional, estando conforme ambas, o passo a passo recomendado é descrito a seguir:

I – Lavagem criteriosa das mãos, uso de luvas descartáveis. Descartar os primeiros jatos de cada quarto mamário antes de iniciar a coleta;

II – Realizar a limpeza de sujidades do teto e realizar o pré-dipping com solução desinfetante, aguardar cerca de 30 segundos;

III – Secar completamente o teto com papel toalha;

IV – Descontaminação das extremidades do teto utilizando álcool 70% por 20 segundos, iniciando dos mais afastados para os mais próximos;

V – Remover a tampa do frasco estéril com cuidado e coletar primeiro dos tetos mais próximos, seguindo para os mais afastados, manter o frasco inclinado e não tocar na extremidade do teto com as mãos;

VI – Coletar de um a três jatos por quarto mamário e, em caso de amostras compostas, um a dois, não encher completamente em caso de congelamento e tampar imediatamente;

VII – Identificar as amostras com caneta permanente e refrigerá-las, congelar caso a cultura vá ocorrer após 24 horas da coleta;

Fonte: Adaptado de Santos e Fonseca (2019) e *National Mastitis Council* (2017).

O seguimento dessas recomendações é essencial para que não haja contaminação da amostra, levando a um resultado fidedigno ao atual estado do animal, também deve ser lembrado que o congelamento de amostras pode ser realizado por até trinta dias sem que haja prejuízo à cultura microbiológica, porém quanto maior a distância entre a coleta e o exame, mais distante do panorama atual da propriedade ele está, podendo não mais representá-lo, havendo muitas vezes cura de animais doentes ou infecção de sadios (REYHER; DOHOO, 2011; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 1989). A cultura a fresco é a que propicia o resultado mais fidedigno, tanto pelo pouco tempo transcorrido, mostrando o panorama atual da propriedade, quanto por não diminuir a viabilidade de alguns patógenos pelo congelamento, como o gênero *Nocardia spp.* e a espécie *Escherichia coli*, porém pode se lidar com esse evento coletando amostras seriadas, aumentando a chance de identificação (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Outro importante adendo é que as amostras podem ser de quartos individuais, guiados pela realização do *California Mastitis Test* (CMT) nos animais, preferencialmente com alta CCS, ou amostras compostas, coletando em conjunto de um ou mais quartos, porém com menor sensibilidade devido a diluição das amostras de quartos doentes pelo leite de quartos sadios e, por fim, alguns microrganismos necessitam de coletas seriadas para sua identificação, por conta de variações no seu padrão de liberação no leite, como o *S. aureus* (BOTARO et al., 2015; REYHER; DOHOO, 2011; SANTOS; FONSECA, 2019; SIMÕES et al., 2013a). Para o envio, preconiza-se que os frascos sejam acondicionados em caixa térmica de isopor ou similar, acompanhados de gelo reciclável, mantendo-as resfriadas entre 2° e 8°C caso a cultura ocorra em tempo inferior a 24 horas, ou as congelando previamente caso algum fator impossibilite-a dentro deste período de tempo (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 1989).

4.1.2 Recepção, identificação e plaqueamento de amostras de leite

Como descrito anteriormente, a recepção de amostras de leite acontece durante toda a semana, porém o processamento ocorrerá apenas nos dois primeiros dias da semana para a viabilização da emissão dos laudos ao fim desta, sem a necessidade de realização de testes aos fins de semana. Assim que recebidas, são registrados dados como a data e o responsável pela

coleta, a identificação dos animais, local da propriedade e se os exames serão custeados de forma particular ou por meio de convênio com algum laticínio atendido pela empresa, partindo então para o processamento das amostras.

As amostras são dispostas em bancada previamente higienizada com álcool 70%, também passando por essa etapa afim de evitar que a contaminação externa do frasco chegue ao leite a ser examinado. Nessa etapa o também ocorrerá o descongelamento em temperatura ambiente de amostras armazenadas, de acordo com a literatura de referência consultada (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 1989), já amostras frescas partem para o plaqueamento direto (Figura 7).

Figura 7 – Amostras de leite higienizadas e dispostas em bancada, prontas para inoculação em meio de cultura.



Fonte: Do autor (2021).

Há a necessidade de homogeneização do leite antes da sua inoculação nos meios de cultura, evitando alterações no exame. Esta é realizada com movimentos circulares, evitando a formação de espuma, que poderia ser coletada pela alça bacteriológica, ocasionando uma menor quantidade de leite a ser inoculada, não representando fielmente a amostra (BRAGA et al., 2013; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). A alça bacteriológica é flambada e em seguida inserida no leite, movimentando-a suavemente no líquido, o conteúdo então é semeado, realizando estriações em zigue zague no meio de cultura.

O meio de cultura utilizado para triagem no Laboratório Cia. do Leite é o ágar sangue, o mesmo preconizado pelo *National Mastitis Council* em 2017 e por Santos e Fonseca em 2019. Este é considerado um meio de cultura rico, composto por ágar base e 5% de sangue desfibrinado de carneiro, permite a observação de halos de alfa e beta hemólise por conta de conservação de hemácias, possibilitando a diferenciação de cepas hemolíticas dos gêneros

Streptococcus e *Staphylococcus* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; QUINN et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019). Os meios de cultura recém inoculados são então dispostos na estufa com a tampa posicionada para baixo, afim de evitar a contaminação que pode ocorrer por conta da condensação da água, que respingaria nos meios de cultura, onde ficarão pelas próximas 18 a 24 horas (Figura 8) (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019).

Figura 8 - Placa de ágar sangue dividida e demarcada com o código de identificação de 8 amostras.



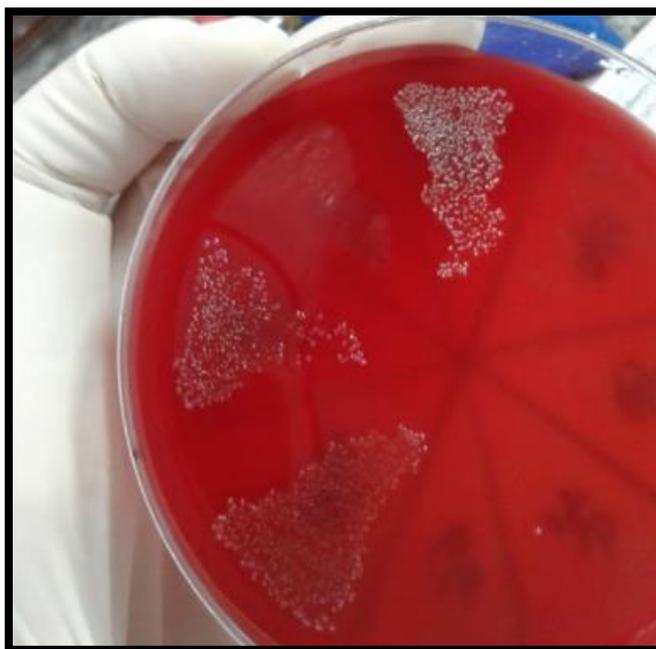
Fonte: Do autor (2021).

4.1.3 Leitura de crescimento de colônias

Decorridas 18 a 24 horas de incubação, a primeira leitura dos meios de cultura ocorrerá, sendo registradas as amostras onde ocorreu o crescimento microbiológico, diferenciando as colônias quanto a tamanho, forma, coloração, aspecto e consistência (Figura 9). A existência de três ou mais colônias morfologicamente distintas crescendo a partir de uma mesma amostra indicam contaminação da mesma, levando ao descarte desta pela rotina diagnóstica (Figura 10) (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Esta contaminação pode ocorrer desde o momento da coleta, resultada de falha no procedimento, até o uso de frascos não estéreis ou erro laboratorial durante a inoculação ou armazenagem na estufa (MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2000; SANTOS; FONSECA, 2019). O crescimento será anotado, com a existência de colônias

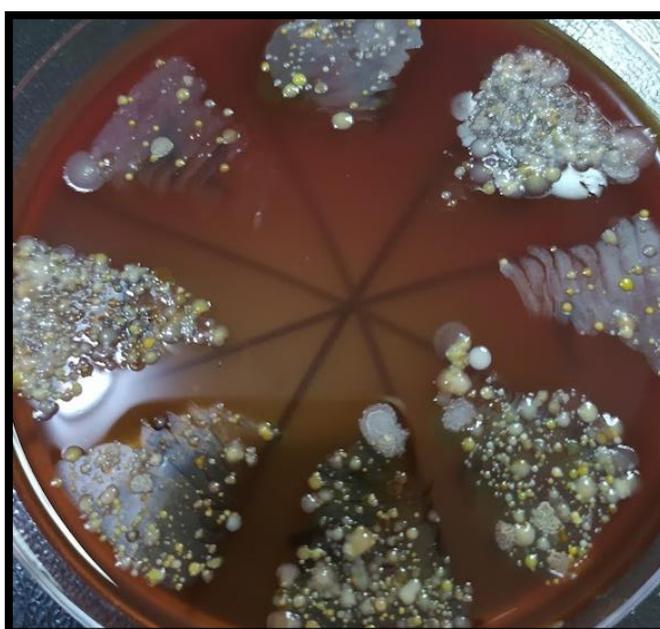
distintas em uma mesma amostra sendo descrita caso ocorra, prosseguindo separadamente para a identificação dos microrganismos, sendo mais comum em amostras compostas de quartos mamários (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017).

Figura 9 - Crescimento de colônias translúcidas no meio ágar sangue em leitura de 24h.



Fonte: Do autor (2021).

Figura 10 - Crescimento de diversas colônias por amostra, denotando contaminação.



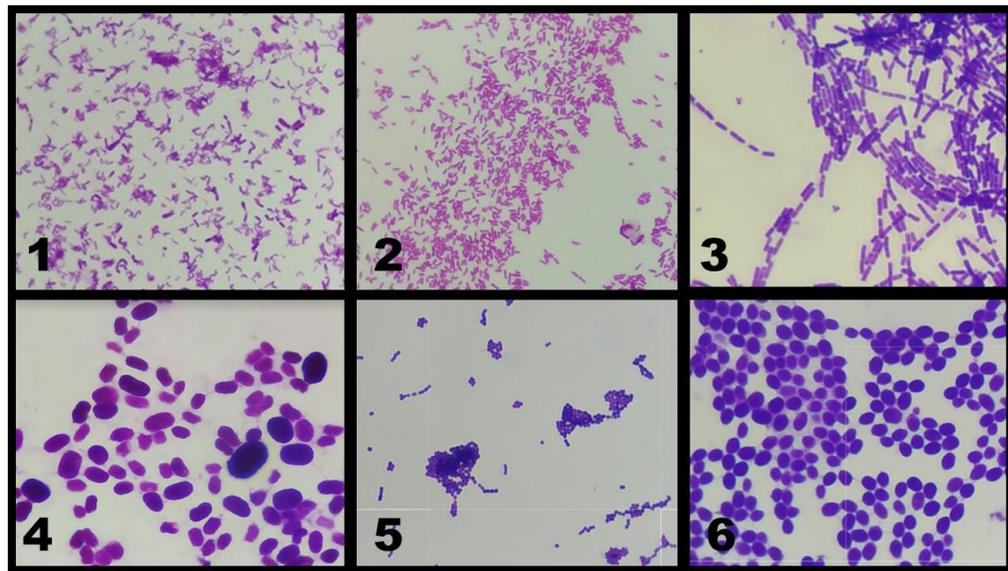
Fonte: Do Autor (2021).

As amostras consideradas negativas na primeira leitura retornam para a estufa de incubação, sendo novamente lidas decorridas 48 horas de sua inoculação no meio. A segunda leitura dá a oportunidade de microrganismos de crescimento fastidioso, como o gênero *Corynebacterium*, e amostras com baixa quantidade de UFC/ml (Unidades Formadoras de Colônias) sejam identificadas, não resultando em falsos negativos na cultura (GONÇALVES et al., 2016; SANTOS; FONSECA, 2019).

4.1.4 Identificação morfológica dos microrganismos e teste de catalase

A identificação da morfologia dos microrganismos ocorre via leitura de esfregaços bacterianos fixados por calor às lâminas e corados utilizando-se da coloração de Gram, com violeta genciana como corante primário e fucsina fenicada como contra corante. As lâminas serão lidas no microscópio óptico na lente objetiva de maior aumento, utilizando-se de óleo de imersão, possibilitando identificar a morfologia dos microrganismos. Os mais comumente identificados na rotina laboratorial são os cocos, bastonetes, bacilos, leveduras, além de raras algas, estes em acordo com os microrganismos causadores de mastite mais comuns listados pela literatura (LEONEL GONÇALVES et al., 2015; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019). Neste estágio, aqueles identificados com morfologia de bastonetes Gram negativos são direcionados para o ágar MacConkey, meio de cultura próprio para estas bactérias (ANVISA, 2004; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019). Na Figura 11 estão as imagens dos diferentes microrganismos classificados em microscopia óptica: 1) Bastonetes pleomórficos gram positivos (presuntivamente identificados como *Corynebacterium spp.*); 2) Bastonetes gram negativos; 3) Bastonete gram positivo (presuntivamente identificado como *Bacillus spp.*); 4) *Prototheca spp.*; 5) Cocos gram positivos; 6) Leveduras.

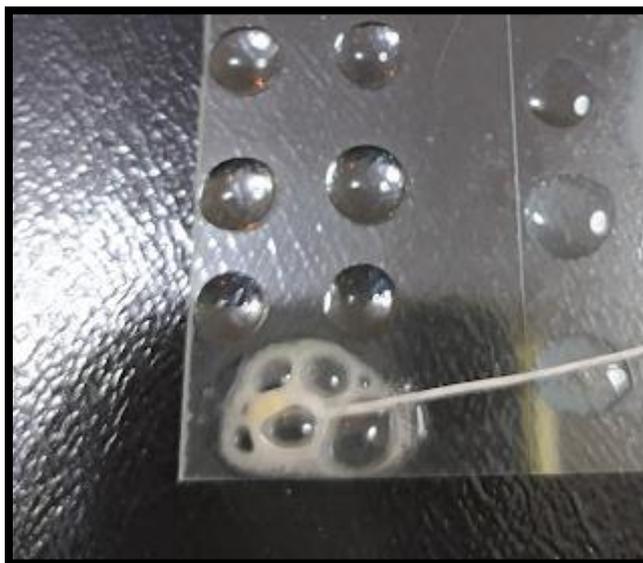
Figura 11 - Imagens de microscopia óptica de diferentes microrganismos/morfologias em aumento de 100x.



Fonte: Do Autor (2021).

Paralelamente à realização dos esfregaços microbiológicos o teste de catalase é realizado, onde a haste bacteriológica já utilizada nestes é imersa em peróxido de hidrogênio, sendo observada a reação positiva com formação de bolhas ou negativa, onde nada acontecerá. Este teste se baseia na reação da enzima catalase com o peróxido de hidrogênio, esta produzida por algumas espécies de microrganismos como forma de neutralizar este metabólito tóxico, produzindo água e oxigênio, o que leva à formação de bolhas durante o teste (Figura 12) (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; QUINN et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019). O principal intuito é separar o gênero *Staphylococcus*, produtor de catalase, dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, cocos não produtores desta enzima, e então direcioná-los para meios de cultura específicos, no caso Ágar sal manitol para os primeiros e ágar CAMP Esculina para os subsequentes, levando à identificação das espécies bacterianas (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019).

Figura 12 - Reação positiva no teste de catalase.



Fonte: Do Autor (2021).

A principal diferença e inconformidade na técnica realizada na rotina é a realização do teste de catalase para todas as amostras, por ser realizada antes da etapa de identificação morfológica, e não realizar a coleta de duas a três colônias diretamente do meio de cultura, como preconizado pelo *National Mastitis Council* em 2017 e Santos e Fonseca em 2019. Tal inconformidade poderia ser corrigida realizando o teste de catalase apenas nas colônias que apresentam a morfologia de cocos, diferenciando os gêneros *Staphylococcus spp.*, catalase positivos, do gênero *Streptococcus spp.*, catalase negativos, associado a coleta direta de colônias do meio de cultura e imersão no peróxido, não utilizando o restante do esfregão bacteriológico. Outro ponto importante é a coleta direta de colônias do ágar sangue, que pode levar a uma fraca reação de eritrócitos residuais com o peróxido de hidrogênio formando bolhas, sendo interpretada como um falso positivo no teste de catalase (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; QUINN et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019).

4.1.4.1 Microrganismos de identificação morfológica direta

Alguns microrganismos são identificados apenas a partir de sua morfologia e Gram à microscopia na rotina laboratorial, em sua maioria são microrganismos causadores de mastite secundários e morfológicamente distintos dos grupos principais isolados. Dentre estes estão os gêneros *Corynebacterium spp.*, bastonete Gram positivo causador de mastite subclínica infecciosa, *Bacillus spp.*, Gram positivos causadores de mastite ambiental, *Prototheca spp.*,

microalga não fotossintetizante de hábitos parasitários causadora de mastite ambiental e leveduras, também causadoras de mastite ambiental (GONÇALVES et al., 2016; LEONEL GONÇALVES et al., 2015; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

4.1.5 Meios de cultura específicos

Passada a fase de triagem, os microrganismos serão direcionados para meios de cultura específicos baseados na morfologia e resposta ao teste de catalase. Estes meios são suplementados com inibidores de crescimento bacteriano, tornando-os seletivos apenas para os gêneros ou famílias específicas e são produzidos no próprio laboratório segundo as diretrizes de boas práticas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estes são os meios ágar sal manitol, usado para *Staphylococcus spp.*, ágar MacConkey, usado para Gram negativos e ágar CAMP Esculina, usado para *Streptococcus spp.* e *Enterococcus spp.* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; SIMÕES et al., 2013b).

4.1.5.1 Ágar Sal Manitol – Estafilococos

O ágar sal manitol é composto por 7,5% de NaCl, onde sua grande concentração inibe o crescimento de bactérias gram negativas e outras gram positivas, permitindo o crescimento principalmente do gênero *Staphylococcus spp.*, e por 1% de D – Manitol, um carboidrato que será utilizado para prova de capacidade de sua fermentação pelas bactérias, os cocos catalase positivos serão transferidos para esse meio. Esse teste permite a triagem de espécies que seriam erroneamente classificadas como *S. aureus* no caso de realização única do teste de coagulase, pois existem cepas coagulase positivas de *S. hyicus* e a espécie, também positiva, *S. intermedius*, as quais não possuem a capacidade de fermentar o manitol e serão filtradas antes do teste da coagulase (PILON et al., 2014; SANTOS; FONSECA, 2019; SILVA; RIZZO, 2019; SIMÕES et al., 2013b).

A fermentação positiva do manitol leva a formação de ácidos, os quais mudam a coloração original do meio, que é rósea, para um tom amarelado em todo o entorno das colônias, como o *S. aureus* é capaz (Figura 13). As espécies incapazes de realizarem a fermentação

formam uma área rósea de tonalidade mais forte que a do meio, as tornando identificáveis (PILON et al., 2014; SANTOS; FONSECA, 2019; SILVA; RIZZO, 2019; SIMÕES et al., 2013a). As amostras positivas no teste serão transferidas para tubos de coagulase, afim de completarem sua identificação, já as negativas são classificadas como ENA (Estafilococos Não Aureus) ou *Staphylococcus* coagulase negativos.

Figura 13 - Ágar Sal Manitol após 24 horas de incubação. É possível visualizar resultados positivos (amarelo) e negativos (rosa).



Fonte: Do Autor (2021).

4.1.5.2 Ágar MacConkey – Gram Negativos

Aqueles microrganismos classificados como bastonetes Gram negativos à microscopia são direcionados para o ágar MacConkey, um meio específico para sua cultura e que possui em sua composição violeta genciana e sais biliares, inibindo o crescimento de microrganismos gram positivos, e lactose, afim de testar a capacidade de fermentação da mesma (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017). A metodologia empregada é a transferência das colônias do ágar sangue para o ágar MacConkey, este então sendo incubado por 24 horas à 37°C de forma invertida.

Aquelas colônias que apresentarem crescimento róseo, muitas vezes com precipitação de sais biliares são capazes de fermentar a lactose, sendo restritas a *Escherichia coli*, a qual

apresenta a precipitação dos sais, *Klebsiella spp.*, apresentando colônias róseo amareladas e mucoides sem a precipitação e o gênero *Enterobacter spp.*, já os gêneros não fermentadores de lactose, como *Hafnia spp.* e *Pseudomonas spp.* apresentam colônias de coloração amarronzada e *Serratia spp.* apresenta colônias vermelhas (Figura 14) (MAARIT NIEMI et al., 2003; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019; SCHUKKEN et al., 2012). As amostras capazes de realizar a fermentação da lactose são direcionadas aos meios de cultura MIO (Motilidade, Indol e Ornitina) e Citrato de Simmons, enquanto as não capazes serão então encaminhadas para o teste de reação de oxidase em tira.

Figura 14 - Ágar MacConkey após incubação. É possível visualizar colônias fermentadoras de lactose (rosa), não fermentadoras (marrom claro) e *Serratia spp.* (vermelhas).



Fonte: Do Autor (2021).

4.1.5.3 Ágar CAMP Esculina – Estreptococos

O último dos meios específicos na segunda etapa é o ágar CAMP Esculina, este utilizado para a identificação de bactérias do gênero *Streptococcus spp.*, em especial o *S. agalactiae* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; KEEFE, 2012; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017). As colônias que apresentarem morfologia de cocos e resposta

negativa ao teste de catalase serão inoculados neste meio de cultura, porém seu processo é diferente das inoculações por estriação comuns.

O plaqueamento se inicia com a semeadura de uma cepa beta hemolítica de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, formando uma linha central, em seguida as colônias a serem testadas serão semeadas em forma de linha perpendicular ao inóculo de *S. aureus*, mantendo uma distância de aproximadamente 0,5cm, pois há o risco de falsos negativos caso se toquem. As placas são incubadas de maneira invertida a 37°C por 24 horas (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019; ZHANG et al., 2018).

A interpretação do teste se dá pela formação ou não de uma área de hemólise entre as duas linhas de semeadura, com o aspecto semelhante a uma flecha ou seta, esta é criada pela interação da proteína conhecida como ‘fator CAMP’ com as hemolisinas produzidas pela cepa de *S. aureus*, potencializando as zonas de hemólise, a reação de CAMP dá a identificação da espécie *Streptococcus agalactiae*, que também apresentará prova de Esculina negativa, não a hidrolisando (Figura 15) (QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019). Vale ressaltar que além do *S. agalactiae* apenas o *S. dysgalactiae* não realizará a hidrólise da Esculina, não ocorrendo o escurecimento do meio em volta da colônia, o *S. dysgalactiae* também apresentará reação CAMP negativa (KEEFE, 2012; RAEMY et al., 2013; ZHANG et al., 2018).

Outros membros do gênero *Streptococcus spp.* e do gênero *Enterococcus spp.* apresentarão no entorno de suas colônias áreas escurecidas por conta de hidrolisarem a Esculina, produzindo esculetina, que reage com o citrato férrico presente no meio, gerando essa coloração (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; RAEMY et al., 2013; SANTOS; FONSECA, 2019; ZHANG et al., 2018). Estes cocos catalase negativos e esculina positivos são transferidos para o ágar bile esculina, afim de obter a confirmação das espécies.

Figura 15 - Reação de CAMP positiva, identificando *S. agalactiae*.



Fonte: Do autor (2021).

4.1.6 Provas confirmatórias

A última etapa da rotina de identificação do Laboratório Cia. do Leite é composta pelos testes confirmatórios, estes definem em suma maioria as espécies dos agentes patogênicos. Existem algumas ressalvas por conta identificação de gêneros e/ou macro grupos compostos por diversas espécies e cepas dentro do mesmo gênero, como os *Staphylococcus* coagulase negativos e os *Streptococcus* ambientais.

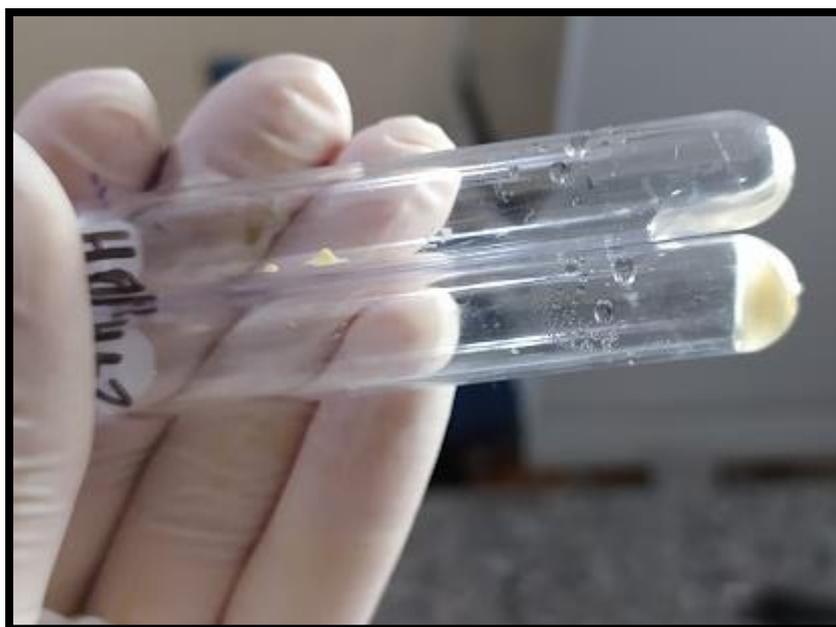
4.1.6.1 Prova de Coagulase

O teste de coagulase é a última etapa dentro da chave de identificação do gênero *Staphylococcus*, diferenciando as amostras com presença de *Staphylococcus aureus* das com presença dos *Staphylococcus* coagulase negativos, estes apresentando patogenicidade menor em relação ao anterior nos casos de mastite. O teste se baseia na reação da coagulase produzida pela bactéria com o plasma de coelho, convertendo o fibrinogênio em fibrina, formando o coágulo de consistência gelatinosa que fica retido ao fundo do tubo mesmo quando este é

movimentado (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; QUINN et al., 2007; SANTOS; FONSECA, 2019).

O teste é realizado inoculando colônias colhidas diretamente do ágar manitol, apenas as que fermentam o carboidrato causam a mudança na coloração do meio, em tubos contendo 0,5ml de plasma de coelho e citrato de sódio, estes são incubados em estufa a 37°C por 18 a 24 horas, procedimento conforme o indicado por Quinn e colaboradores (2007) e o *National Mastitis Council* (2017). A leitura dos testes é realizada transcorrido esse tempo, onde as amostras que realizarem a formação do coágulo, conferindo a consistência gelatinosa ao conteúdo, são classificadas como *Staphylococcus aureus*, já aquelas incapazes de realiza-lo são classificados como *Staphylococcus* coagulase negativos, conforme descrito por Santos e Fonseca em 2019 e Quinn e colaboradores em 2007 (Figura 16).

Figura 16 - Prova de coagulase negativa (acima) e positiva (abaixo).



Fonte: Do autor (2021).

4.1.6.2 Meio MIO

O meio de cultura MIO (Motilidade, Indol e Ornitina) é um dos dois meios de cultura utilizados para a identificação de bactérias Gram negativas fermentadoras de lactose, destas identificadas no Laboratório Cia. do Leite se enquadram *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e

Enterobacter spp. Os parâmetros observados são a motilidade, descarboxilação de ornitina e produção de indol.

A motilidade é evidenciada pelo turvamento do meio devido a multiplicação bacteriana, sendo negativa caso a mesma ocorra apenas na linha de inóculo por pique. A descarboxilação de ornitina pela enzima ornitina descarboxilase, produz a putrescina, a qual torna todo o meio arroxeadado, caso não ocorra o meio se torna amarelado. O último parâmetro é observação da produção de indol, um metabólito produzido pelo uso do aminoácido triptofano pela bactéria, a qual é verificado pelo uso do reagente de Kovacs, que forma um halo avermelhado quando positivo e mantendo apenas a coloração amarelo – esverdeada do reagente quando negativa.

As colônias a serem identificadas são inoculadas diretamente do ágar MacConkey com o auxílio de uma agulha microbiológica, esta com a colônia em sua ponta é inserida no tubo de MIO, sem encostar nas laterais do mesmo, em linha reta tanto na colocação quanto retirada. Os tubos então são incubados a 37°C por 24 horas em estufa, sendo então realizada a leitura e o teste de produção indol.

A motilidade e uso da ornitina são vistos sem a necessidade de testes subsequentes, utilizando-se dos parâmetros citados anteriormente, turvamento e coloração do meio, já a produção de indol é verificada pela adição de duas a quatro gotas do reagente de Kovacs (que contém butanol, ácido clorídrico e benzaldeídos), aguardando de um a dois minutos, o indol produzido pela hidrólise completa do triptofano então reagirá com os demais compostos, o que gera um anel rosado na zona de contato, sendo então positiva a reação (Figura 17).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2008, a motilidade é positiva em 95% das cepas de *E. coli*, negativa em todas as espécies do gênero *Klebsiella spp.*, e variando entre 85% a 97% no gênero *Enterobacter spp.* A produção de Indol é presente em 98% das cepas de *E. coli*, os gêneros *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.* em grande maioria não o produzem, com exceção de *K. oxytoca* (99% das cepas), e *E. agglomerans* (20% das cepas). Por fim, a degradação da ornitina, onde 65% das cepas de *E. coli*, 91% a 100% dentro do gênero *Enterobacter spp.* (apenas *E. agglomerans* sendo incapaz) e dentro do gênero *Klebsiella spp.* nenhuma das espécies de importância para a mastite bovina, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, possuem a capacidade para tal. Vistos estes dados, apenas o meio MIO apenas não provê dados suficientes para a identificação correta e precisa dos patógenos portanto, sendo realizado em paralelo com o meio Citrato de Simmons para a maior confiabilidade da identificação do agente causador.

Figura 17 - Meio MIO apresentando motilidade, indol e ornitina positivos (esquerda) e negativos (direita).



Fonte: Do Autor (2021).

4.1.6.3 Citrato de Simmons

Paralelamente ao meio MIO o ágar Citrato de Simmons é utilizado como a outra metade da parte final da rotina de identificação de bactérias gram negativas fermentadoras de lactose. O teste é baseado em identificar se os microrganismos testados possuem capacidade de utilizar a molécula de citrato de sódio como fonte de carbono e sais de amônia como suas fontes de nitrogênio, diferenciando a *E. coli*, incapaz de tal, dos gêneros *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*, que são capazes (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007). O resultado positivo se dá pela mudança na coloração do meio por conta do aumento do pH do meio com o uso do citrato e sais de amônia, passando de seu verde original para azul, porém em alguns casos o crescimento de colônias neste já é considerado como prova da capacidade da utilização (Figura 18).

As colônias serão inoculadas no meio de forma cuidadosa com o fio bacteriológico, as espalhando bem afim de evitar grande densidade, que pode acidificar o meio e o tornar amarelo, em seguida são incubadas a 37°C. A leitura se dá 24 horas após a inoculação microbiológica, registrando então as colônias positivas para o teste, já as negativas serão incubadas por 24 horas

novamente, estas só são consideradas incapazes do uso do citrato após duas leituras consecutivas negativas, 24 e 48 horas. Segundo a literatura, os resultados negativos ou inconclusivos podem ser incubados por até 72 horas, totalizando três leituras, o que difere da metodologia adotada, que possibilita falsos negativos e identificação errônea principalmente de espécimes do gênero *Enterobacter spp.* como *Escherichia coli* (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; QUINN et al., 2007; SCHUKKEN et al., 2012).

Figura 18 - Ágar Citrato de Simmons negativo (verde) e positivo (azul).



Fonte: Do Autor (2021).

Ao fim dos testes, os resultados dos testes do meio MIO e Citrato de Simmons são comparados, utilizando-se da tabela a seguir:

Tabela 1 - Resultados esperados dos testes para a identificação de Gram Negativos da família *Enterobacteriaceae*.

Espécie	Motilidade	Indol	Ornitina	Citrato
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+/-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	-	+
<i>Enterobacter spp.</i>	+	-/+	+	+

Fonte: Do autor (2021).

4.1.6.4 Teste de Oxidase

A prova de oxidase em tira é o método de escolha do Laboratório Cia. do Leite para a diferenciação dos patógenos gram negativos não fermentadores de lactose no ágar MacConkey. Este consiste na verificação da produção da enzima oxidase pela colônia avaliada, sendo disposta na tira de oxidase comercial com o auxílio de palitos de madeira, afim de evitar falsos positivos, caso a fita mude de coloração para roxo, o espécime é considerado oxidase positivo, já quando não há a mudança na coloração, este é considerado negativo (Figura 19).

Na rotina laboratorial o teste é usado para diferenciar o gênero *Pseudomonas spp.*, não fermentador de lactose e oxidase positivo, do gênero *Hafnia spp.*, uma enterobactéria sem capacidade de fermentação de lactose e oxidase negativa como o resto da família *Enterobacteriaceae* (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007). Porém, existem duas inconformidades no procedimento de rotina do Laboratório Cia. do Leite quanto a identificação de não fermentadores de lactose, a realização do teste de oxidase com colônias retiradas diretamente do ágar MacConkey, contrariando o recomendado pela ANVISA em 2013, e a utilização do resultado negativo como único fator para a identificação do gênero *Hafnia spp.*, pois esta pode ter identificação cruzada com o gênero *Proteus spp.*, também oxidase negativa, mesmo que os fatores predisponentes para estes patógenos sejam os mesmos e sua ocorrência seja baixa é recomendável que sejam utilizados testes auxiliares para a correta identificação de espécies bacterianas (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016; NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; QUINN et al., 2007).

Figura 19 - Teste de Oxidase em tira positivo (acima) e negativo (abaixo).



Fonte: Do Autor (2021).

4.1.6.5 Prova de Bile Esculina

A prova de bile esculina consiste em testar a capacidade de hidrólise da bile esculina em esculetina, formando composto enegrecido quando em contato com o citrato férrico, em um meio de cultura que possui sais biliares em sua composição, que inibem o crescimento de alguns microrganismos (Figura 20). O teste é usado para diferenciar o *Streptococcus uberis* dos demais *Streptococcus spp.* e do gênero *Enterococcus spp.* (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019).

As colônias que apresentaram hidrólise positiva da esculina e CAMP negativo no ágar CAMP – Esculina são transferidas com auxílio da alça bacteriológica para o ágar Bile Esculina, onde serão incubadas por 24 horas a 37°C em posição invertida da placa. O crescimento no meio acompanhado da hidrólise da esculina caracteriza os *Streptococcus spp.* ambientais e o gênero *Enterococcus spp.*, que são direcionados para a prova de PYR, o *Streptococcus uberis* não é capaz de crescer neste meio, sendo inibido pelos sais biliares, sendo então identificado (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; RAEMY et al., 2013; SANTOS; FONSECA, 2019).

Figura 20 - Prova de Bile Esculina positiva.



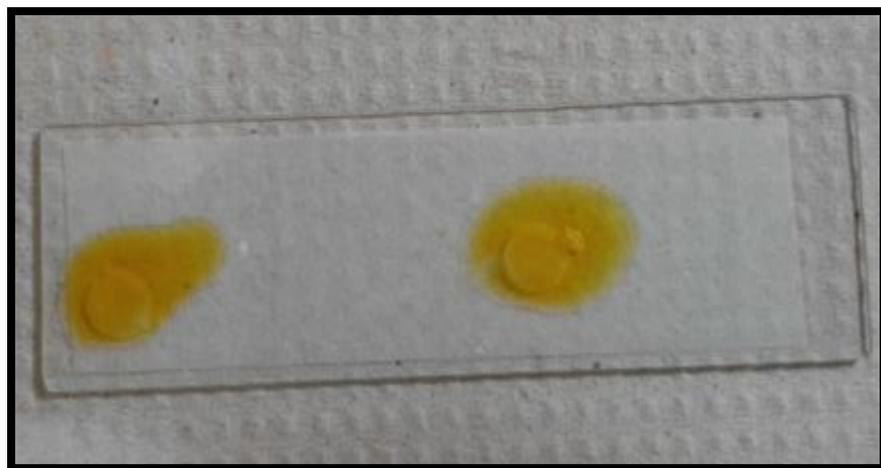
Fonte: Do Autor (2021).

4.1.6.6 Prova de PYR

A prova de PYR é o último teste na identificação dos cocos catalase negativos na rotina laboratorial acompanhada, sendo utilizado para diferenciar *Streptococcus spp.* ambientais, negativos para a reação, do gênero *Enterococcus spp.*, positivos para a mesma. A reação em si consiste na degradação do ácido piroglutâmico pela enzima bacteriana piroglutamil – aminopeptidase, liberando naftalimida, a qual reage com aldeídos presentes no reagente de PYR, formando uma coloração avermelhada (Figura 21) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; RAEMY et al., 2013).

O teste é realizado no laboratório em lâmina de vidro, umedecendo um disco contendo ácido piroglutâmico com água destilada e realizando um esfregaço denso da colônia no mesmo, aguardando 5 minutos e então adicionando uma gota do reagente de PYR e aguardando até um minuto para a mudança de coloração para vermelho caso positivo, ou mantendo a coloração original caso negativo, sendo então diferenciados o gênero *Enterococcus spp.* dos *Streptococcus* ambientais. Essa metodologia entra em conflito com a literatura vigente, que recomenda que o disco seja disposto sobre as colônias em meio de cultura e incubado por 4 horas a 37°C, e só então realizada a colocação do reagente de PYR (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; RAEMY et al., 2013; TORTORA; FUNKE; CASE, 2019).

Figura 21 - Prova de PYR negativa.



Fonte: Do Autor (2021).

4.1.7 Confecção e emissão de laudos

Os laudos são confeccionados assim que a fase de identificação de microrganismos chega ao fim, onde as amostras são tabeladas juntamente com seus microrganismos identificados, caso haja crescimento microbiano da amostra e enviados aos técnicos e clientes que os requisitaram. A figura 22 é um exemplo de laudo de cultura microbiológica de leite emitido pelo laboratório estagiado:

Figura 22 - Exemplo de laudo de cultura microbiológica.



Laboratório de Análises Microbiológicas Cia do Leite
 Teixeira Laboratório Veterinário
 Rua José Maria de Azevedo, nº262 - Bairro Jardim Fabiana - CEP 37200-359 - Lavras/MG
 E-mail: laboratorio.ciadoleite@gmail.com
 Fone: (35) 99902-5696/(35) 3409-7434

Produtor: ██████████
 Fazenda: ██████████
 Cidade: Ijaci
 Responsável pela coleta: ██████████
 Data de coleta: 08/11/2021
 Data de entrada: 08/11/2021

Tubo	Vaca	Resultado	Quarto	Observação
1	Isabela	<i>Corynebacterium spp.</i>		
2	Roma	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>		
3	Amora	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i>		
4	Hungria	Sem Crescimento		
5	Estrela	<i>Sem Crescimento</i>		
6	Tieta	Levedura		
7	Pitanga	<i>Corynebacterium spp.</i>		
8	Pintura	<i>Sem Crescimento</i>		
9	Veluda	<i>Staphylococcus aureus</i>		
10	Fumaça	<i>Sem Crescimento</i>		

Responsável Técnica

Fonte: Laboratório Cia. do Leite (2021).

Com os dados de identificação microbiológica em mãos e os espécimes bacterianos isolados é possível a realização também do antibiograma para cada um destes. Sua realização permite um tratamento ainda mais eficiente dos casos de mastite clínica, e juntamente das culturas promove o uso consciente de antibióticos.

4.2 Cultura de amostras de tanque de expansão

A cultura microbiológica composta, ou seja, do tanque de expansão da propriedade como um todo é uma ferramenta de avaliação quantitativa de microrganismos no leite, servindo como indicador de possíveis IIM e da higiene dos equipamentos e processo de ordenha como um todo, além da pesquisa de patógenos causadores de mastite de maior importância no rebanho, como *Streptococcus agalactiae* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SANTOS; FONSECA, 2019). Porém esta técnica não deve ser usada como única forma de diagnóstico, e a ausência de agentes encontrados pode significar baixa quantidade por conta de diluição ou simplesmente ciclos de não liberação de microrganismos no leite, no caso do *S. aureus* (KEEFE, 2012; OLIVEIRA, 2012; SANTOS; FONSECA, 2019).

O laboratório estagiado utiliza-se de três meios de cultura para a realização deste teste, Ágar MacConkey, para a identificação de coliformes, Ágar Vogel – Johnson para a identificação de *Staphylococcus aureus* e outras bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* e, por fim, um meio de cultura cromogênico específico para identificação de *Streptococcus spp.* do grupo B de Lancefield, especialmente o *S. agalactiae*. O principal foco é a identificação de patógenos causadores de mastite contagiosa no rebanho e do estado geral de higiene da propriedade, em conforme com o uso recomendado pelo *National Mastitis Council* nos anos de 2004 e 2017.

4.2.1 Descrição do método utilizado

A amostra a ser testada é previamente identificada e descongelada em temperatura ambiente, em seguida 1ml de leite é pipetado de forma estéril e diluído em 9ml de água destilada estéril, realizando uma diluição de 1:10. Realizada a diluição, 1ml da solução é pipetado e inoculado em cada um dos meios de cultura, sendo espalhada pelo ágar com o auxílio de alça bacteriológica estéril descartável com cuidado para não ocasionar seu rompimento, aguarda-se cerca de 5 minutos até que o ágar absorva completamente a solução e então as placas identificadas partem para a incubação em estufa por 18 a 24 horas.

Decorrida a incubação, a leitura é realizada, feita a contagem das colônias em cada meio de cultura, sendo então multiplicados por 10, afim de obter-se o número de UFC/ml de leite

analisado. Recomenda-se a ausência de colônias de *S. aureus* e *S. agalactiae*, e caso encontrados que sejam rastreados os animais reservatório destes patógenos através do *California Mastitis Test (CMT)* associado a cultura microbiológica do leite dos animais positivos, os *Staphylococcus* coagulase negativos e *Streptococcus* ambientais devem estar abaixo de 500UFC/ml, acima deste valor é sugerido o rastreo de possíveis casos de mastite por estes patógenos, além de higienização mais rigorosa do recinto dos animais e realização do pré-dipping e, por fim, a contagem recomendada pelo laboratório para coliformes é abaixo de 50 UFC/ml, e não coliformes abaixo de 200 UFC/ml. A metodologia utilizada é conforme o recomendado pelo *National Mastitis Council (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2004, 2017)* e Santos e Fonseca (SANTOS; FONSECA, 2019).

4.2.2 Ágar Vogel – Johnson

O ágar Vogel – Johnson possui em sua composição telurito de potássio, que atua como inibidor de espécies bacterianas fora do gênero *Staphylococcus spp.*, o qual também é reduzido pelo *Staphylococcus* coagulase positivos até a forma livre metálica, o telúrio, tornando suas colônias negras. Também usa manitol como fonte de carbono, onde os estafilococos capazes de utilizá-lo tornarão o meio amarelado no entorno de suas colônias, como já descrito anteriormente (BAIRD; LEE, 1995; KIM; OH, 2010; QUINN et al., 2007).

A leitura se dará classificando colônias negras, redutoras de telurito de potássio, e fermentadoras de manitol como *S. aureus*, único dentro do gênero capaz de ambos. As demais colônias não fermentadoras de manitol e incapazes da redução do telurito são classificadas como *Staphylococcus* coagulase negativos no laudo final (Figura 23).

Figura 23 - Ágar Vogel - Johnson utilizado para análise de perfil microbiológico de tanque.



Fonte: Do Autor (2021).

4.2.3 Ágar MacConkey

O ágar MacConkey, também usado na rotina microbiológica padrão do Laboratório Cia. do Leite e descrito anteriormente, tem em sua composição cristal violeta e sais biliares para a inibição de bactérias gram positivas e lactose como uma das fontes de carbono, sendo observada sua fermentação por coloração rósea nas colônias. A metodologia de contagem se baseia na diferenciação de colônias fermentadoras de lactose, de coloração rosa, classificadas como coliformes, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* dos não fermentadores, coloração amarronzada, os classificando como não coliformes apenas (Figura 24). Sua existência na amostra em valores acima dos estipulados indica possível contaminação ou falha no manejo de pré-dipping, aliado a falhas na higiene de ordenha e armazenamento como um todo (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 2017; SCHUKKEN et al., 2012).

Figura 24 - Ágar MacConkey utilizado para análise de perfil microbiológico de tanque.



Fonte: Do Autor (2021).

4.2.4 Meio Cromogênico Strepto B

É um meio comercial utilizado para a identificação de *Streptococcus spp.* do grupo B de Lancefield, com ênfase no *S. agalactiae*. Utiliza um mix de antibióticos para a inibição das demais espécies bacterianas e suplementos cromogênicos que mudam a coloração das colônias em crescimento no meio.

A leitura é dada conforme a coloração das colônias, com as colônias de *Streptococcus agalactiae* se tornando azul turquesa e as colônias das demais espécies do gênero sendo de coloração esbranquiçada (Figura 25). O gênero *Enterococcus spp.* pode sobreviver à combinação de antibióticos, sendo erroneamente caracterizado como *Streptococcus spp.* (PERRY, 2017; RAEMY et al., 2013).

Figura 25- Colônias de *S. agalactiae* em meio cromogênico Strepto B.



Fonte: Do Autor (2021).

4.3 Antibiograma

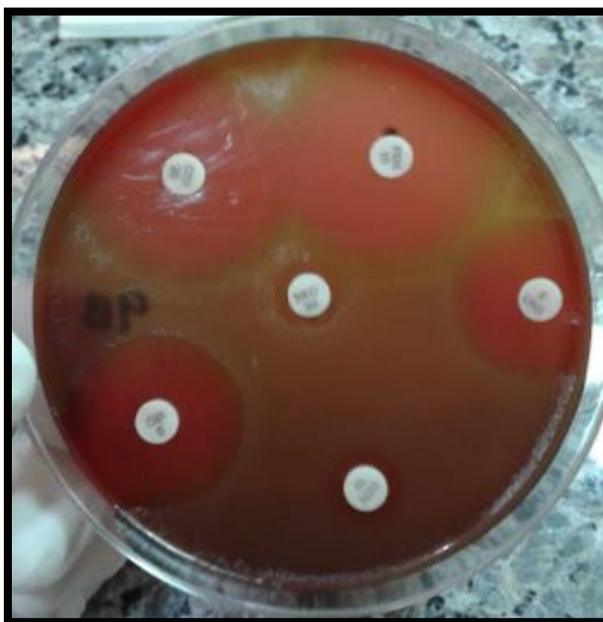
Os antibiogramas são exames para a verificação de resistência ou susceptibilidade bacteriana, geralmente realizados com diversas moléculas diferentes ao mesmo tempo, avaliando a cultura em estudo. Na rotina acompanhada, estes exames são feitos apenas em casos específicos, se tratando de uma entidade particular a realização depende da solicitação ou aceite do cliente. São seguidas as recomendações gerais da Anvisa e do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), com sua norma global consensual para a realização do exame.

O teste é feito após o término da rotina de identificação dos microrganismos, as colônias isoladas são replaqueadas em ágar sangue, afim de se obter colônias puras no meio para a realização do teste. Estas colônias são colhidas e diluídas em solução fisiológica estéril em um tubo de ensaio, até que atinja a turbidez coincidente com a solução de McFarland 0,5. Em seguida é mergulhado um *swab* estéril de algodão no líquido, tirando o excesso do mesmo e o passando no meio de cultura, no caso o ágar Müeller – Hinton, este escolhido por não afetar a inibição do crescimento bacteriano por antibióticos, o *swab* é passado por todo o meio até a borda.

Os discos impregnados com antibióticos são colocados no meio de cultura de forma equidistante, afim de evitar a interpolação de suas zonas de inibição bacteriana, inviabilizando a leitura, feito o posicionamento devem ser pressionados levemente, afim de aderir ao ágar. Aguarda-se de 5 a 15 minutos para a aderência do disco e que o inóculo seque, e então os meios são incubados em estufa por 18 a 24 horas a 37°C. Vale ressaltar que no caso de teste realizado com o gênero *Streptococcus spp.* o ágar Müller – Hinton é suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro, afim de verificar as zonas de hemólise e enriquecer o meio para as bactérias (Figura 26) (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2020; QUINN et al., 2007).

Os antibióticos utilizados no teste pelo laboratório são Cefotiofur, Amoxicilina com clavulanato, Ciprofloxacina, Neomicina, Tetraciclina e Gentamicina, todos de uso comum para o tratamento da mastite bovina (FUQUAY; FOX; MCSWEENEY, 2011; WILSON et al., 1999). Decorrida a incubação, os halos de inibição são medidos com o auxílio de um paquímetro digital, os classificando como Susceptíveis, Intermediários ou Resistentes, baseando-se no diâmetro do halo de inibição e no antibiótico utilizado e os interpretando utilizando-se das informações dispostas pelo CLSI em 2020.

Figura 26 - Antibiograma em ágar Müller - Hinton Sangue.



Fonte: Do Autor (2021).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A mastite é um dos grandes desafios enfrentados pelo produtor de leite, muitas vezes elusiva a seus olhos, causando prejuízos invisíveis e visíveis para toda a cadeia leiteira. Seu diagnóstico preciso é uma necessidade, visto que a profissionalização do setor não permite espaço para amadorismos e ‘diagnósticos de porteira’, tratando a mastite de qualquer forma, independentemente do agente causador.

Todos os exames realizados e agentes identificados representam apenas uma ínfima parte do panorama de três estados, Minas Gerais, São Paulo e Paraná, e torna-se ainda menor em comparação a vastidão continental do Brasil. Cada propriedade é única, precisa de metodologia própria adaptada a sua realidade, seja pelo manejo adotado, tipo de ordenha, agentes patogênicos presentes no rebanho e outras restrições, sendo ubiqüitária a necessidade da figura do médico veterinário na cadeia leiteira.

É também pertinente avaliar que o laboratório estagiado possui algumas falhas em seus procedimentos, principalmente quanto a identificação de microrganismos Gram negativos não fermentadores de lactose, o qual seria benéfica a utilização de testes adicionais ou paralelos, pois a identificação errônea desses microrganismos pode ser uma realidade, como exemplo o gênero *Serratia spp.*, visto que apenas são identificados como tal as colônias gram negativas de crescimento vermelho no ágar sangue e ágar MacConkey, porém apenas 20% são pigmentadas, com o restante sendo de coloração acinzentada e, já que não fermentam a lactose e são oxidase negativas, podem ser erroneamente classificadas no gênero *Hafnia spp.* pela atual metodologia.

A adição do meio TSI na rotina seria benéfico para a identificação de gram negativos, possibilitando maior precisão diagnóstica. Porém se tratando de um laboratório comercial, deve ser estudada a viabilidade financeira de tal.

6 CONCLUSÕES

O Laboratório Cia. do Leite me proporcionou muitas experiências benéficas, além de crescimento nos âmbitos pessoal e profissional, tendo criado desafios e possibilidades de estudo e reflexão para a solução destes.

Ainda concluo que há muito a se estudar e desenvolver quanto a mastite bovina, e o próximo grande desafio é a transição para uma era de diagnósticos laboratoriais moleculares, propiciando maior rapidez e precisão de diagnóstico, porém ainda limitado pelo custo da técnica. Além de que a cultura microbiológica tradicional tem uma grande oportunidade de expansão e desenvolvimento se tratando da cultura na fazenda, buscando novas combinações e novos meios e a tornando ainda mais acessível e confiável.

O aprendizado obtido durante este período de estágio certamente se mostra inestimável para a formação profissional, o qual será aplicado não mais apenas em laboratório e será levado para junto da clínica de grandes animais como um todo, abrindo novos horizontes e ampliando ainda mais a busca por conhecimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Módulo 5: Tecnologias em Serviços de Saúde: Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos. **Microbiologia Clínica Para O Controle De Infecção Relacionada À Assistência À Saúde**, p. 95, 2013.

ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos Módulo IV. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. IV, p. 1–66, 2004.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: CORRY, J. E. L.; CURTIS, G. D. W.; BAIRD, R. M. (Eds.). **Handbook of Culture Media for Food Microbiology**. 1ª ed. [s.l.] Elsevier, 1995. v. 34p. 77–87.

BOTARO, B. G. et al. *Staphylococcus aureus* intramammary infection affects milk yield and SCC of dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 61–66, 2015.

BRAGA, P. A. C. et al. Bacterial identification: From the agar plate to the mass spectrometer. **RSC Advances**, v. 3, n. 4, p. 994–1008, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals**. 5ª ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

FUQUAY, J. W.; FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. 2ª ed. Londres: Elsevier Ltd, 2011.

GONÇALVES, J. L. et al. Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. **Veterinary Journal**, v. 209, p. 87–92, 2016.

KEEFE, G. Update on control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for management of mastitis. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 203–216, 2012.

KIM, H. J.; OH, S. W. Performance comparison of 5 selective media used to detect *Staphylococcus aureus* in foods. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 1097–1101, ago. 2010.

LEONEL GONÇALVES, J. et al. Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3613–3621, 2015.

MAARIT NIEMI, R. et al. Confirmation of *Escherichia coli* and its distinction from *Klebsiella* species by gas and indole formation at 44 and 44.5°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 6, p. 1242–1249, 2003.

MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Manual de procedimentos básicos em microbiologia clínica para o controle de infecção hospitalar : módulo 1**. 1ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. Using Bulk Tank Milk Cultures in a Dairy Practice. **National Mastitis Council** , p. 1–3, 2004.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Laboratory Handbook on Bovine Mastitis**. 3ª ed. New Prague, Minnesota, USA: National Mastitis Council, 2017.

OLIVEIRA, E. **MASTITE BOVINA: CONTROLE E PREVENÇÃO**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012.

PERRY, J. D. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics: IMPACT OF LABORATORY AUTOMATION ON THE USE OF CHROMOGENIC MEDIA. **Clinical microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 1–31, 2017.

PILON, L. E. et al. Coagulase-negative Staphylococcus species isolated from the mammary gland of sheep with subclinical mastitis . **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 8, n. 5, 2014.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 2007.

RAEMY, A. et al. Phenotypic and genotypic identification of streptococci and related bacteria isolated from bovine intramammary infections. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 55, p. 53, 2013.

REYHER, K. K.; DOHOO, I. R. Diagnosing intramammary infections: Evaluation of composite milk samples to detect intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3387–3396, 2011.

SANTOS, M. V. DOS; FONSECA, L. F. L. DA. **Controle da Mastite e Qualidade do Leite - Desafios e Soluções**. 1ª ed. Pirassununga, SP: Edição dos autores, 2019.

SCHUKKEN, Y. et al. The “Other” Gram-Negative Bacteria in Mastitis. Klebsiella, Serratia, and More. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 28, n. 2, p. 239–256, 2012.

SCHUKKEN, Y. H. et al. Effect of Freezing on Bacteriologic Culturing of Mastitis Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 7, p. 1900–1906, 1989.

SILVA, A. T. F.; RIZZO, H. EFEITOS DA MASTITE POR Staphylococcus COAGULASE NEGATIVA SOBRE A QUALIDADE DO LEITE: UMA REVISÃO. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 32, p. 1–14, 2019.

SIMÕES, T. V. M. D. et al. **Identificação Laboratorial de Staphylococcus aureus em Leite Bovino**. 1ª ed. Aracaju, SE: EMBRAPA, 2013a.

SIMÕES, T. V. M. D. et al. **Identificação Laboratorial de Staphylococcus aureus em Leite Bovino**. 1º ed. Aracaju, SE: EMBRAPA, 2013b.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology, An Introduction**. 13^a ed. Estados Unidos da América: Pearson, 2019.

WILSON, D. J. et al. Comparison of seven antibiotic treatments with no treatment for bacteriological efficacy against bovine mastitis pathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 8, p. 1664–1670, 1999.

ZHANG, S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance profiles in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from bovine clinical mastitis in 5 provinces of China. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 3344–3355, 1 abr. 2018.