

Isolamento de agentes microbianos a partir de amostras de sangue e umbigo de bezerros mestiços neonatos

Silvana Acosta RENGIFO¹
Rosângela Antunes da SILVA¹

Ingrid Annes PEREIRA¹
Jonathan Quiroz ZEGARRA¹
Miliane Moreira de SOUZA¹
Rita de Cássia Campbell Machado BOTTEON¹

Correspondência para:
SILVANA ACOSTA RENGIFO
Veterinária da Universidade Federal Rural
do Rio Janeiro, BR 465 Km 07, 23851-970
- Seropédica – Rio de Janeiro – RJ
rbotteon@ufrj.br

Recebido para publicação: 06/10/2003
Aprovado para publicação: 15/03/2005

1 – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ

Resumo

Infecção das estruturas umbilicais pode resultar em bacteremia, septicemia e morte em neonatos com falha na imunidade passiva sendo os microrganismos usuais de onfalites isolados freqüentemente em animais com bacteremia. Um estudo foi desenvolvido entre setembro 2002 e setembro 2003 utilizando-se 44 bezerros, visando verificar a freqüência de bacteremia em bezerros neonatos e a correlação entre os agentes isolados a partir de amostras de sangue de estruturas umbilicais. Amostras de sangue foram obtidas por punção da jugular e submetidas à cultura para isolamento de agentes microbianos, sendo 24 obtidas entre 48 e 72 horas e 20 entre o terceiro e o quinto dia após o nascimento. Através de “Swabs” procedeu-se à coleta de material das estruturas umbilicais para a mesma finalidade. Obteve-se crescimento microbiano em 17 (38,67%) amostras de sangue e 100% das amostras de estruturas umbilicais. Os microrganismos mais freqüentes em amostras de sangue foram *Staphylococcus sp.*, *E. coli*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas sp.* e *Streptococcus*. Todos os animais com bacteremia apresentaram manifestações de enfermidade focal ou sistêmica. O sinal clínico mais freqüentemente relacionado com cultura de sangue positiva foi o espessamento das estruturas umbilicais. *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp, *Micrococcus* spp. e *E. coli* foram os microrganismos isolados das estruturas umbilicais. Os dados confirmam uma flora bacteriana mista nos casos de onfalite e sugerem uma prevalência alta de bacteremia em bezerros neonatos, sobretudo aqueles com onfalite, evidenciando a importância de boa transmissão de imunoglobulinas através do colostro.

Palavras-chaves:
Bacteremia.
Onfalite
Bezerros neonatos.

Introdução

O desempenho de qualquer sistema de produção de leite está diretamente ligado às condições sanitárias e nutricionais do rebanho. A criação de bezerros constitui, sem dúvida, a fase mais crítica e determinante sobre o futuro de uma exploração leiteira. O neonato é especialmente vulnerável, devido a sua relativa incapacidade de manter a temperatura corpórea a sua menor competência imunológica. Este fato o torna dependente da ingestão de colostro com nível adequado de anticorpos, fornecido em quantidade e tempo certos, como também da ingestão freqüente de carboidratos

prontamente utilizáveis para manter a energia. O animal neonato freqüentemente apresenta desafios diagnósticos e terapêuticos e, por esse motivo, o diagnóstico e o tratamento devem ser consideravelmente acurados e rápidos¹.

A falha de transferência passiva das imunoglobulinas do colostro e as práticas de manejo com higiene deficiente são os maiores determinantes de mortalidade dos bezerros^{2,3}. Desta forma, minimizar a exposição aos patógenos é certamente um dos métodos mais fáceis e de menor custo benéfico para aumentar o índice de sobrevivência desses animais³. A deficiente transferência passiva de imunoglobulinas, seja

por abandono materno ou incapacidade de mamar leva à inanição e aumento da suscetibilidade a infecções, com efeitos sobre a taxa de mortalidade e incidência de enfermidades como colibacilose, poliartrites, septicemia e a maioria das infecções entéricas virais no período compreendido entre dois e sete dias de idade.

As causas mais comuns de perdas de animais na fase de cria em propriedades leiteiras são as doenças entéricas, as respiratórias e a septicemia pós-natal^{1,4}. A maioria das infecções neonatais é causada por bactérias oportunistas que residem no trato genital, na pele ou no ambiente⁵. A infecção das estruturas umbilicais é comum em animais com falha na imunidade passiva, e pode resultar em bacteremia, septicemia e morte em neonatos. Microrganismos usuais de onfalite são freqüentemente isolados em animais com bacteremia e septicemia, comprovando que as estruturas umbilicais são importantes portas de entrada para agentes causadores destas patologias^{1,5,6,7}.

Muitos agentes diferentes podem resultar em bacteremia e septicemia. Bactérias aeróbias gram negativas são a causa predominante de septicemia em potros e bezerros recém nascidos⁵. *Escherichia coli* e *Salmonella spp* são citados como os agentes causais mais freqüentes em casos de bacteremia e septicemia em bezerros¹.

Os sinais iniciais de septicemia no recém nascido são vagos, inespecíficos e, com freqüência, indistinguíveis dos de doença não infecciosa ou infecções focais. Recém nascidos septicêmicos com freqüência desenvolvem um quadro de choque séptico que pode resultar em falência múltipla de órgãos com pequenas chances de êxito em um plano terapêutico. Os neonatos com septicemia podem morrer no 1º ou 2º dia de vida, sem mostrar qualquer sintoma a não ser pulso fraco e hipotermia, muitas vezes sem evidência de diarreia ou infecção umbilical^{8,9}.

O presente estudo foi desenvolvido visando verificar a freqüência de bacteremia em bezerros neonatos e a correlação entre

os agentes isolados a partir de amostras de sangue e estruturas umbilicais.

Materiais e Métodos

O experimento foi conduzido utilizando-se 44 bezerros, machos e fêmeas, pertencentes ao rebanho da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, localizada na BR 465 Km 07, em Seropédica, Rio de Janeiro, em duas estações de nascimento compreendidas entre setembro e dezembro de 2002 (24 bezerros) e maio e setembro 2003 (20 bezerros). Ao nascer os bezerros foram mantidos com as mães por 24 horas, com a recomendação aos tratadores que nesse período procedessem à cura do umbigo. Após esse período, os animais foram alojados em baias individuais de alvenaria, em barracão único, com baias paralelas divididas por um corredor central, com piso cimentado e estrado de madeira sobreposto. A higienização das baias consistiu de caiação antes da entrada dos bezerros e limpeza diária com água sob pressão. Após apartação, procedeu-se à “cura” do umbigo com solução de iodo 10% e os animais foram pesados, identificados e examinados individualmente. Alimentação consistiu de leite integral oferecido em balde num total de quatro litros por dia, em duas mamadas até o décimo dia. Após esse período, concentrado comercial e igual volume de leite passou a ser fornecido somente pela manhã e os animais foram mantidos em piquetes coletivos de Capim Estrela Africana (*Cynodum nelfuensis*) durante o dia, permanecendo estabulados durante a noite até o desmame aos 56 dias. Em um primeiro momento (setembro a dezembro de 2002), entre 48 e 72 horas do nascimento, amostras de sangue foram obtidas por punção venosa da jugular, em frascos a vácuo (Vacumainers) com anticoagulante (Fluoreto de sódio), após anti-sepsia local com solução degermante e álcool iodado e submetidas à cultura para isolamento de agentes microbianos no Departamento de

Microbiologia e Imunologia Veterinária da UFRRJ. No momento da coleta, os animais foram examinados individualmente visando identificar a ocorrência de enfermidades, com especial atenção aos processos inflamatórios umbilicais. No segundo momento (setembro a dezembro de 2003), amostras de sangue foram obtidas de forma semelhante entre o terceiro e o quinto dia após o nascimento e igualmente encaminhadas para isolamento de agentes microbianos. Paralelamente procedeu-se através de “*Smabs*” à coleta de material das estruturas umbilicais para a mesma finalidade.

O isolamento primário foi realizado em ágar sangue de carneiro a 5% e ágar infusão de cérebro e coração. As colônias isoladas foram submetidas aos procedimentos de identificação presuntiva: coloração pelo método de Gram, prova da catalase e prova do hidróxido de potássio a 3%. De acordo com as características avaliadas, os isolados eram submetidos a repiques em meios seletivos e diferenciados. Para o reisolamento de *Staphylococcus spp* foram utilizados os ágares Manitol Vermelho de Fenol e Baird Parker para observação dos aspectos fenotípicos característicos do gênero. A identificação foi efetuada por meio do procedimento padrão: prova da coagulase livre, resistência a bacitracina, provas bioquímicas: Voges-Proskauer, fermentação da maltose, redução de nitratos, produção de urease. A identificação das bactérias do gênero *Streptococcus spp* foi efetuada através do repique em meio seletivo específico, e posteriormente através da inoculação em leite adicionado de azul de metileno, prova da optoquina e das provas de hidrólise de esculina e hipurato. O reisolamento da enterobactérias foi realizado nas ágares MaConkey e Eosina-Azul de metileno. As colônias isoladas foram identificadas segundo as seguintes provas de identificação: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro, motilidade em tubo, produção do Indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase,

produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microrganismo envolvido. Os isolados de *Pseudomonas spp* foram identificados segundo as características de produção de pigmentos e odor característicos e bateria de diferenciação para bactérias não-fermentadoras¹⁰.

Resultados e Discussão

Das amostras avaliadas inicialmente obteve-se crescimento microbiano em 11 (45,83%) das 24 amostras de sangue submetidas à cultura. Os microrganismos isolados foram *Staphylococcus spp.* (16,66%), *E. coli* (16,7%), *Pseudomonas spp.* (8,33%) e *Streptococcus spp.* (4,15%).

Quinze (62%) dos 24 bezerros avaliados apresentaram sinais de enfermidades ao exame clínico. Alterações identificadas ao exame clínico incluíram processo inflamatório das estruturas umbilicais (13 bezerros), congestão de mucosas (3), tempo de preenchimento capilar (TPC) aumentado (3), retração do globo ocular (3), diarreia (2), apatia e hipertermia (2). Por outro lado, mucosas ocular e oral hipocoradas foram registradas em cinco animais.

Todos os animais com bacteremia confirmada apresentaram manifestações de enfermidade focal ou sistêmica. O sinal clínico que mais frequentemente esteve relacionado com cultura de amostra de sangue venoso positiva foi o espessamento das estruturas umbilicais. Onfalite foi diagnosticada em oito (72,7%) dos onze animais dos quais se obteve cultura de amostras de sangue positivas, o que significa que em 61,53% dos animais que tiveram onfalite, foi possível o isolamento de agentes bacterianos a partir de amostras de sangue. Bactérias dos gêneros *Staphylococcus spp*, *Escherichia coli* e *Streptococcus spp* foram os microrganismos isolados nestes casos. Desidratação de moderada a grave foi registrada em três animais dos quais foi possível o isolamento de *Staphylococcus spp*,

Pseudomonas spp e *E.coli*, sendo que dois destes animais estavam com diarreia no dia da coleta de sangue. Depressão, febre e evidências de endotoxemia foram comuns aos isolamentos de *E.coli* e *Streptococcus spp*.

Dos 20 bezerros avaliados entre maio e setembro de 2003, obteve-se crescimento microbiano em 100% das amostras obtidas a partir das estruturas umbilicais. *Bacillus spp* (3) *Enterobacter spp*, (3), *Micrococcus spp*.(3); *E. coli* (3); foram os microrganismos isolados com maior frequência. Outros agentes identificados foram *Staphylococcus spp.* (2), Estafilococos coagulase-negativos (ECN) (2), *Serratia marcescens* (1), *Citrobacter freundii* (2); *Klebsiella pneumoniae* (1) e leveduras (2). Infecções mistas, com três ou mais agentes isolados, foram registradas em seis das nove amostras estudadas. Por outro lado, isolamento de um único microrganismo (ECN e *E.coli*) ocorreu em três amostras.

Os dados confirmam o que registra a literatura, no que se refere a uma microbiota bacteriana mista presente nos casos de onfalite. Hathaway et al.⁶ aponta que *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus spp.* e *Actinomyces (Corynebacterium) pyogenes* são os microrganismos mais isolados em casos de onfalite. No presente estudo, *E.coli*, foi um dos agentes mais comuns, contudo *Proteus spp* e *A. pyogenes* não foram isolados. Vale ressaltar que no presente estudo, foram obtidas amostras de estruturas umbilicais de tantos bezerros quantos foi possível a coleta (nove), fato impossibilitado na maioria das vezes em que a cura do umbigo resultava em retração e desidratação das estruturas umbilicais impossibilitando a introdução do *Swab* para coleta do material. Nos casos em que a coleta se concretizou, em geral o cordão umbilical apresentava-se úmido, friável e não necessariamente com evidência de processo inflamatório no momento da coleta (primeiro dia, após a apartação), contudo, onfalite foi confirmada nos exames clínicos de quatro desses animais.

Neste segundo momento, entre as 20 amostras de sangue enviadas para cultura, obteve-se crescimento bacteriano em seis

(30%), sendo todas culturas únicas de *Bacillus spp* (2), *Micrococcus spp.* (1), ECN (1) ou *E. coli* (2). Os agentes *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Streptococcus spp* isolados anteriormente não foram isolados nesta segunda etapa. *E. coli* manteve-se como um dos agentes mais isolados.

As principais enfermidades identificadas ao exame clínico destes animais, foram da mesma forma que no estudo realizado entre setembro e dezembro de 2002, onfalite (3) e diarreia (2) que acometeram concomitantemente outros sete animais (35%). Todos os animais com bacteremia confirmada pela cultura de sangue, em algum momento apresentaram manifestações de enfermidade.

A infecção do umbigo ocorre logo após o nascimento, acomete entre 5 e 10% dos bezerros recém-nascidos^{7,8,12} e pode resultar em onfalite com possibilidade de disseminação ocasionando bacteremia, septicemia e morte^{6,7}. A maioria das infecções segundo Hathaway et al.⁶, progride para áreas além do umbigo. No primeiro momento, obteve-se crescimento microbiano em amostras de sangue de onze animais (45%), sendo oito com onfalite (72,7%) e no segundo momento, confirmou-se a bacteremia em seis (30%) bezerros com onfalite. A frequência de isolamentos de agentes bacterianos em amostras de sangue de bezerros com onfalite pode ser atribuída à cura inadequada ou tardia do umbigo, que provavelmente consistiu em porta de entrada para os microrganismos, confirmando o que sugerem diferentes autores^{1,5,6,7}.

No presente estudo, a incidência elevada de onfalite e significativamente superior àquela registrada na literatura foi provavelmente decorrente do fato de a cura efetiva do umbigo ter sido realizada após 24 horas de permanência com as mães, em contradição ao que preconiza a literatura⁶. Ainda que a cura do umbigo logo após o nascimento seja recomendada aos tratadores, acredita-se que devido às inúmeras atribuições e atividades desenvolvidas

rotineiramente dentro do sistema de produção de leite, esta prática seja negligenciada. Condição semelhante, com elevada prevalência de processos inflamatórios das estruturas umbilicais (36,4%) foi relatada por Miessa et al.¹¹, no mesmo rebanho estudado e atribuído à dificuldade de instituir a cura do umbigo o mais cedo possível após o parto e a exigência de atenção e mão de obra específica para esta finalidade.

Os agentes isolados a partir de amostras de sangue constituem agentes comuns nos casos de onfalite, ainda que em poucos casos o agente isolado de estruturas umbilicais e do sangue tenham sido os mesmos. Vale ressaltar que as coletas de sangue foram realizadas entre 24 e 72 horas do nascimento no primeiro estudo (setembro a dezembro de 2002), e entre o terceiro e quinto dias, no segundo momento

(maio a setembro de 2003), resultando em ambos os casos em grande número de isolamentos, ainda que a frequência de isolamentos tenha sido maior entre as amostras obtidas mais precocemente. O momento da coleta provavelmente influenciou sobre o número de isolamentos, ainda que a literatura registre o isolamento de agentes microbianos em cerca de 33% das amostras de sangue obtidas de bezerros no quinto dia após o nascimento¹³.

Conclusões

Os resultados sugerem uma prevalência alta de bacteremia em bezerros neonatos, sobretudo aqueles com processos inflamatórios das estruturas umbilicais e evidenciam a importância de boa transmissão de imunoglobulinas através do colostro.

Microorganisms isolated from blood samples and umbilical structures of newborns calves

Abstract

Umbilical structures infections can be followed by bacteremic, septicemic infections and death in newborns with passive immunity deficiency. Microorganisms isolated in omphalitis have been also isolated from animals with bacteremia. From september/2002 to september/2003, a research was developed using 44 calves, in order to evaluate bacteremia frequency in newborns and to correlate microorganisms isolated from blood samples and umbilical structures. Blood samples were collected from jugular vein for microorganisms isolation. Twenty four samples were collected in a period of 24 to 48 hours, the other 20 samples from thirty to fifty days after birth. Umbilical structures materials were collected through swabs. Microbial growth occurred in 17 (38,67%) blood samples and in 100% of umbilical samples. *Staphylococcus* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. and *Streptococcus* spp were the major isolated microorganisms from blood. All bacteremic animals presented systemic or localized clinical manifestations. The most reported clinical sign was thickness of umbilical structures. *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp, *Micrococcus* spp. and *E. coli* were isolated from umbilical structures. Data confirm a mixed bacterial environment in omphalitis, and suggest a high prevalence of bacteremic infections in newborns calves, pointing out the need of passive immunity transfer through colostrum.

Key-words:
Bacteremic.
Omphalitis.
Ccalves.

Referencias

- 1 RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 56-59.
- 2 LEANDER, L. C.; VIANA, F. C.; PASSOS, L. M. I.; GALVÃO, C. L. Alguns aspectos do manejo sanitário e principais doenças em bovinos. **Tecnologia Agropecuária**, Belo Horizonte, v. 6, n. 4, p. 1-51, 1984.
- 3 DONOVAN, G. A.; DOHOO, R. I.; MONTGOMERY, D. M.; BENNETT, F. L. Cattle morbidity and mortality: passive immunity. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 34, n. 1, p. 31-46, 1998.
- 4 WALTNER, T. D.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H. An epidemiological study of selected calf pathogens on holstein dairy farms in Southwestern Ontario. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 50, p. 307-313, 1986.
- 5 OGILVIE, T. H. **Medicina interna de grandes animais**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000. p. 468-470.
- 6 HATHAWAY, S. C. et al. A Pathological and microbiological on phalo phlebitis in very young calves slaughtered in New-Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 41, n. 4, p. 166-170, 1993.
- 7 REBHUM, W. C. Urinary tract diseases. In: **Diseases of dairy cattle**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1995. p. 365-366.
- 8 SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. 1. ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 303-314.
- 9 KASARI, T. R.; ROUSSEL, A. J. Neonatal disease and disease management. In: HOWARD, J. L.; SMITH, R. A. **Current veterinary therapy**. Food animal practice. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1999. p. 62-65.
- 10 KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. et al. **Diagnóstico microbiológico**: Texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465 p.
- 11 MIESSA, L. C. et al. Morbidade e mortalidade de bezerros leiteiros devido a processos inflamatórios do cordão umbilical. **A Hora Veterinária**. v. 23, n. 134, p. 16-18, jul./ago., 2003.
- 12 CORREA, F. R. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. 2. ed. São Paulo: Varela. 2001. p. 327-329.
- 13 LOFSTEDT, J.; DOHOO I. R.; DUIZER, G. Model to predict septicemia in diarrheic calves. **Journal Veterinary Int. Medicine**, v. 13, n. 2, p. 79-80, 1999.