

PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICO NO PERFIL MICROBIOLÓGICO E RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS DO LEITE

ALMADA, André Felipe Berto¹
SANTOS, Isabela Carvalho²
BARBOSA, Lidiane Nunes³
BORGES, Jesse Lahos⁴
PIAU JUNIOR, Ranulfo⁵

RESUMO

O leite é um meio de cultura rico em microrganismos, alguns deles são benéficos como os *Lactobacillus* e outros maléficos os quais causam grandes prejuízos ao setor, como os *Staphylococcus* e outros microrganismos, com isso o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento da contagem de bactérias Gram-Negativas, *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e fungos em amostras de leite e observar a sensibilidade de bacilos Gram-Negativos e *Staphylococcus* spp. a antimicrobianos em animais que receberam probióticos e simbióticos na dieta. O leite analisado foi proveniente de vacas da raça Holandesa divididas em 3 grupos de 8 animais cada, o grupo controle recebia 100 gramas de concentrado na ordenha da tarde, o grupo PRO recebia 100 gramas de concentrado enriquecido com 5 gramas de probióticos na ordenha da tarde, enquanto o grupo SIM era tratado com 5 gramas de probióticos e 5 gramas de probióticos misturados a 100 gramas de concentrado. As coletas de leite para análise foram realizadas no início do experimento (D0), no dia 30 (D30) e no dia 60 (D60). Não foi observada diferenças significativas nas contagens de Gram-negativas, *Staphylococcus* e fungos, para a contagem de *Lactobacillus* foi observado uma diminuição da contagem do grupo SIM. A resistência de algumas bactérias a ação de antibióticos é uma preocupação na saúde única, porém não ficou evidenciada a influência na sensibilidade a antibióticos.

PALAVRAS-CHAVE: Fungos. Gram-Negativo. *Lactobacillus*. Qualidade do leite. *Staphylococcus*.

PROBIOTICS AND SYMBIOTICS IN THE MICROBIOLOGICAL PROFILE AND ANTIBIOTICS RESISTANCE IN MILK BACTERIA

ABSTRACT

Milk is a culture medium rich in microorganisms, some of them are beneficial such as *Lactobacillus* and other harmful substances that cause great damage to the sector, such as *Staphylococcus* and other microorganisms. Gram-negative bacteria, *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. and fungi in milk samples and observe the sensitivity of Gram-negative and *Staphylococcus* spp. to antimicrobials in animals that received probiotics and symbiotics in the diet. The milk analyzed came from Holstein cows divided into 3 groups of 8 animals each, the control group received 100 grams of concentrate in the afternoon milking, the PRO group received 100 grams of concentrate enriched with 5 grams of probiotics in the afternoon milking, while the SIM group was treated with 5 grams of probiotics and 5 grams of probiotics mixed with 100 grams of concentrate. Milk samples for analysis were performed at the beginning of the experiment (D0), on day 30 (D30) and on day 60 (D60). No significant differences in Gram-negative, *Staphylococcus* and fungi counts were observed, for *Lactobacillus* count a decrease in the SIM group count was observed. Resistance of some bacteria to antibiotic action is a unique health concern, but the influence on antibiotic sensitivity has not been evidenced.

KEYWORDS: Fungi. Gram negative. *Lactobacillus*. Milk quality. *Staphylococcus*.

¹ Doutorando em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Unipar. E-mail: andrefelipe@zootecnista.com.br

² Doutoranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Unipar. E-mail: isabela_carvalhoxd@hotmail.com.

³ Docente do programa de Pós Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Unipar. E-mail: linuba2@gmail.com.

⁴ Doutorando em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos da Unipar. E-mail: lahosjesse@gmail.com.

⁵ Docente do programa de Pós Graduação em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. E-mail: piau@prof.unipar.br.

1. INTRODUÇÃO

O leite é um importante alimento na dieta de humanos no mundo todo, porém pode ser um meio de cultura para microrganismos, inclusive aqueles indesejados, principalmente quando não é corretamente processado (VALIM et al., 2009), porém quando devidamente manipulado, diminui o risco de incidência de unidade formadoras de colônias (UFC) de microrganismos, garantindo melhor segurança alimentar (SILVA et al., 2013).

Muitas bactérias oferecem riscos para atividade leiteira, causando inflamações, mastites e outros problemas, no entanto o *Staphylococcus aureus* é uma das mais nocivas na atividade e de difícil tratamento (LANGONI et al., 2009). O tratamento com antibióticos ainda é o mais usual no controle da mastite bovina, no entanto é possível observar uma resistência dos microrganismos a vários produtos comumente utilizados no mercado (SAIDI et al., 2019).

Segundo SARTORI, SANTOS e MARIN, (2012) não só bactérias podem trazer prejuízos para o setor, fungos também exercem um papel de agente contaminador em vacas em lactação.

O controle de microrganismos causadores da mastite é geralmente feito com produtos químicos, Schuch et al. (2008), destacam que alguns produtos naturais, como extratos de plantas podem ter efeitos positivos no controle da mastite, quando aplicados no pós dipping.

Langoni (2013) destaca a importância de todos os envolvidos na cadeia produtiva do leite adotar medidas que garantam maior qualidade do produto, podendo com isso agregar valor ao produto e aumentar o desempenho econômico da atividade.

Neste contexto outras formas de controle da mastite estão sendo estudadas, como probióticos e prebióticos.

Porém, apesar de resultados animadores, os trabalhos realizados *in vivo* não deixam claro a ação destes aditivos nos microrganismos específicos, indicando uma carência de pesquisas que detalhem estes mecanismos de ação. Informações sobre o comportamento da suplementação oral destes produtos também são úteis para o melhor uso de probióticos, prebióticos e simbióticos em animais de produção, pois se tratam de imunomoduladores.

Deste modo, o presente estudo teve como objetivo estudar diferentes ação de diferentes microrganismos e avaliar a influência no perfil de resistência aos antibióticos de *Staphylococcus.spp.* e isolados Gram-Negativos de vacas da raça Holandesa tratadas com probióticos e simbióticos

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A nocividade do *Staphylococcus aureus* é muito séria na atividade leiteira, podendo servir de critério de seleção em rebanhos comerciais, animais que apresentem reincidência de contaminação por este microrganismo (LANGONI et al., 2009).

Alguns fungos, como por exemplo, os do gênero *Candida* também preocupam o desenvolvimento da atividade leiteira, fazendo com que alguns cuidados devem ser feitos para diminuir o impacto destes agentes contaminantes (SARTORI, SANTOS e MARIN, 2012).

Demeu et al. (2011), destacaram que custos com prevenção da mastite geralmente é mais baixo que o tratamento. Os autores ainda ressaltaram que os descartes do leite e das matrizes significam o maior dos custos na atividade.

Souza et al. (2018), observaram *in vitro* que o probiótico *Lactobacillus casei* tem efeito positivo no combate ao *Staphylococcus aureus* e também funciona como imunomodulador indicando uma ação benéfica no combate a mastite. Os autores fazem a ressalva que os probióticos também devem ser avaliados *in vivo*.

Rajamanickam, Yang e Sakharkar (2019), também encontraram fontes alternativas para o tratamento da mastite bovina, os autores observaram que compostos fitoquímicos combateram os agentes causadores da mastite e impediram a formação de biofilmes.

Também é possível observar os probióticos sendo utilizados em outras formas no auxílio ao combate aos microrganismos que acometem os tetos das vacas de produção. Pellegrino et al. (2017), apontaram que o uso intramamário de probióticos tem função positiva na prevenção na proliferação de microrganismos causadores de mastite, os autores destacam que este bioativo produz ações imunomoduladoras no hospedeiro.

Outro bioativo, os prebióticos também estão sendo avaliados como alternativa no tratamento de mastites bovinas. Silva et al. (2018), observaram que o Beta-glucano intramamário tem efeito positivo no controle de mastite bovina.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Ciência Animal da Universidade Paranaense sobre o protocolo 33276/2018.

O experimento foi realizado nos meses de julho, agosto e setembro de 2018, com vacas da raça Holandesa pertencentes ao rebanho do hospital veterinário da Universidade Paranaense. O trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Paranaense.

Os animais foram randomizados e distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de 8 vacas cada. O grupo 1 ou grupo controle, recebia diariamente 100 gramas de ração convencional durante a ordenha; o grupo 2 ou grupo PRO recebia diariamente 100 gramas de ração enriquecida com 5 gramas de probiótico durante a ordenha; e o grupo 3 ou grupo SIM recebia diariamente 100 gramas de ração enriquecida com 5 gramas de probiótico e 5 gramas de prebiótico durante a ordenha.

Os níveis de garantia dos bacilos utilizados foi, *Bacillus subtilis* ($3,0 \times 10^9$ UFC/g), *Bifidobacterium bifidum* ($1,0 \times 10^9$ UFC/g), *Enterococcus faecium* ($1,0 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus acidophilus* ($1,0 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus buchneri* ($2,0 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus casei* ($1,0 \times 10^9$ UFC/g), *Lactobacillus lactis* ($1,0 \times 10^9$ UFC/g) e como levedura utilizou *Saccharomyces cerevisiae* (2×10^8 UFC/g), este produto foi utilizado no grupo PRO e SIM. O prebiótico utilizado no grupo SIM foi o Betaglucano (Beta 1,3/1,6 glucanos) que é um extrato purificado da *Saccharomyces cerevisiae*.

Para a coleta do leite, os tetos eram higienizados com água corrente, solução clorada e secos com toalha de papel, em seguida desprezava-se os primeiros jatos de cada teto, depois era feita uma desinfecção de cada teto com álcool 70°. O leite de cada animal era coletado com um *pool* de cada teto, em quantidade semelhante, em tubo estéril, em seguida o tubo era identificado e acondicionado em uma caixa térmica com gelo reutilizável.

No período máximo de duas horas as amostras de leite foram levadas para o laboratório de microbiologia do programa de pós-graduação em ciência animal da universidade paranaense, onde era conservado na geladeira.

As análises microbiológicas, 25 mL da amostra foram homogeneizados em 225 mL de água tamponada. A partir desta diluição inicial a 10^{-1} , em seguida 10^{-2} e finalizando em 10^{-3} foram preparadas uma série de diluições decimais seriadas, utilizando-se o mesmo diluente (MORTON, 2001).

A contagem de bolores e leveduras foi realizada pela técnica de semeadura em superfície, utilizando placas com o meio de cultura *Sabouraud*, em que 0,1 mL de cada diluição foram semeados com auxílio de um bastão em L. As placas foram incubadas (27°C / 7 dias) e a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) foi realizada nas placas contendo entre 25 e 250 colônias (MORTON, 2001). Para a enumeração dos *Staphylococcus* spp. 0,1 mL das diversas diluições da amostra foram semeadas, com auxílio de um bastão em L, em placas com ágar Baird-Parker (BP) adicionado de telurito de potássio e solução de gema de ovo, sendo feita incubação a 35°C /48 horas, seguida de contagem de UFC (LANCETTE; BENNETT, 2001). O mesmo procedimento foi realizado para contagem de bactérias Gram negativas, alterando-se o ágar BP por ágar *MacConkey*. O cálculo

de número de UFC/mL, foi obtido pela multiplicação por 10 do número de colônias e pelo fator inverso de diluição da placa de contagem.

Já para a contagem de *Lactobacillus* spp. foi utilizado o meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS) fundido (45°C), onde 1 mL de cada diluição da amostra foi adicionado a uma placa de Petri vazia e, então, o meio de cultura foi adicionado e homogeneizado junto ao inóculo. Após a solidificação do meio, as placas foram cobertas com 8 mL de MRS fundido. As placas solidificadas foram incubadas (36°C/24-72h) para posterior contagem das UFC. O cálculo de número de UFC/mL, foi obtido multiplicando-se o número de colônias pelo fator inverso de diluição da placa de contagem.

Os isolados de *Staphylococcus* spp. e bacilos Gram-negativos foram submetidos a análise de características macroscópicas, coloração de Gram e testes bioquímicos (KONEMAN e ALLEN, 2008). Os cocos gram-positivos catalase positiva foram submetidos a prova da coagulase para classificação em *Staphylococcus* coagulase positiva ou *Staphylococcus* coagulase negativa. A identificação bioquímica das bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae foi realizada por meio de um conjunto de provas bioquímicas incluídos no “Kit para Enterobactérias” (NewProv®, Paraná, Brasil), segundo recomendações do fabricante.

As placas foram feitas em duplicata e as UFC/MI foram contadas, analisadas e representadas, foi considerado como valor absoluto uma média das UFC entre as placas.

Os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2013). Cada isolado de *Staphylococcus* spp. e bactérias Gram-negativas foram submetidos ao antibiograma para determinação do perfil de resistência, identificando a amostra com potencial risco a saúde pública.

Para avaliação de Cocos positivos utilizou-se dos seguintes antibióticos: Cefepime (CPM 30µg), Ciprofloxacina (CIP - 5µg), Cloranfenicol (CLO - 30µg), Clindamicina (CLI - 2µg), Eritromicina (ERI 15µg), Gentamicina (GEN - 10µg), Oxacilina (OXA - 1µg), Penicilina (PEN - 10µg), Rifampicina (RIF - 5µg), Sulfazotrin (SUT - 24µg), Tetraciclina (TET - 30µg) e (Vancomicina (VAN - 30µg).

Os antibióticos testados para bacilos Gram negativos foram: Ampicilina (AMP - 10 µg), Amicacina (AMI - 30 µg), Amoxicilina + Clavulanato (AMC - 20/10 µg), Ceftazidina (CAZ 30µg), Cefepime (CPM 30µg), Cefoxitina (CFO - 30µg), Cefuroxima (CRX - 30µg), Ciprofloxacina (CIP - 5µg), Gentamicina (GEN - 10µg), Meropenem (MER 10µg), Cefalotina (CFL - 30µg) e Sulfazotrim (SUT - 24µg).

Para o cálculo do índice da multirresistência foi utilizada a fórmula descrita por Krumperman (1983), $a/(b.c)$, onde a é o número, somado, de antimicrobianos que as amostras apresentaram resistência, b é o número de antimicrobianos testados, e c é o número de amostras. O índice para

delimitar se as amostras são de alto ou baixo risco foi de 0,200, onde abaixo de 0,199 é considerado de baixo risco e a partir de 0,200 considerado de alto risco.

Já para avaliar o índice de multirresistência de cada amostra utilizou-se outra fórmula, também descrita por Krumperman (1983), a/b , onde a é o número de antimicrobiano contra os quais o isolado era resistente, e b o número de antimicrobianos testados.

As análises estatísticas utilizadas foram representadas por porcentagens (%). Para o nível de significância dos tratamentos, foi considerado como significativo uma variação de 50% no perfil microbiológico.

4. ANÁLISE E DISCUÇÃO DOS RESULTADOS

Nas amostras de leite do presente trabalho foram encontrados bacilos Gram-Negativos, Lactobacillos, fungos e *Staphylococcus*.

Foi observado ausência de contagem de Gram-Negativos em todos os grupos do presente estudo no D30, os grupos PRO e controle também mostram 100% das amostras com 0 de contagem, enquanto o grupo SIM teve 12,5% na mesma coleta. Esses resultados indicam que os tratamentos não influenciaram esse comportamento (Tabela 1).

Tabela 1: Percentual da contagem de bactérias Gram-Negativas compreendidas entre 0 UFC/mL e 0,5-20 UFC/mL em amostras de leite de vacas tratados com simbióticos, probióticos e controle no D0, D30 e D60.

| | D0 | | D30 | | D60 | |
|----------|-------|--------|------|--------|-------|--------|
| | 0 | 0,5-20 | 0 | 0,5-20 | 0 | 0,5-20 |
| SIM | 87,5% | 12,5% | 100% | 0,0% | 87,5% | 12,5% |
| PRO | 75% | 25% | 100% | 0,0% | 100% | 0,0% |
| Controle | 75% | 25% | 100% | 0,0% | 100% | 0,0% |

Letras minúsculas significa diferença de 50% entre colunas.

Não foi observado diferenças significativas no comportamento da contagem de bactérias Gram-Negativas, no D30 todos os grupos apresentaram ausência de contagem e no D60 apenas o grupo SIM indicou de 0,5-20 UFC/mL.

Fuenzalida e Ruegg (2019) destacam que bactérias Gram-Negativas são potencialmente causadoras de mastite, oferecendo risco para a sanidade do leite e da vaca. Porém o presente estudo não mostra contagens elevadas destas bactérias, nem variações significativas mediante aos tratamentos.

O *Staphylococcus* spp. é um microrganismo corriqueiramente causador da mastite bovina e normalmente esta associado a multirresistência (ARMAS, CAMPERIO e MARIANELLI, 2017).

Algumas cepas de interesse veterinário não apresentam sensibilidade a alguns antibióticos, este problema estende a produção animal, afetando os seres humanos, de forma que todos os meios sanitários são integrados (SAIDI et al., 2019).

A Tabela 2 mostra o percentual de amostras de leite contaminado com *Staphylococcus* spp.

Tabela 2: Percentual da contagem de *Staphylococcus* spp. compreendidos entre 0 UFC/ mL, 0,5-5 UFC/mL e 5,5-20 UFC/mL em amostras de leite de vacas tratados com simbióticos, probióticos e controle no D0, D30 e D60.

| | D0 | | | D30 | | | D60 | | |
|----------|-------|-------|--------|-------|---------|--------|------|-------|--------|
| | 0 | 0,5-5 | 5,5-20 | 0 | 0,5 a 5 | 5,5-20 | 0 | 0,5-5 | 5,5-20 |
| SIM | 87,5% | 0,0% | 12,5% | 100% | 0,0% | 0,0% | 75% | 25% | 0,0% |
| PRO | 87,5% | 12,5% | 0,0% | 87,5% | 12,5% | 0,0% | 100% | 0,0% | 0,0% |
| Controle | 100% | 0,0% | 0,0% | 100% | 0,0% | 0,0% | 75% | 25% | 0,0% |

Letras minúsculas significa diferença de 50% entre colunas.

Não fica claro a ação dos SIM e PRO no combate do *Staphylococcus* spp., indicando que o uso dos aditivos via oral não influencia no combate deste agente potencial causador de mastite.

Corroborando com estes resultados, Armas, Camperio e Marianelli (2017), também não encontraram diferenças significantes na diminuição de *Staphylococcus* spp. *in vitro* com o uso de um probiótico, no entanto os autores apontam uma diminuição numérica desta bactéria. Os autores destacam a necessidade de estudos em vivo.

Godoy-Santos et al. (2019), em um estudo com isolados de microrganismos retirados do leite bovino observam que o uso de uma bacteriocina tem grande potencial no combate e controle do *Staphylococcus* spp. Estes resultados são bem diferentes dos encontrados no presente estudo, que utilizou os probióticos e simbióticos como aditivos alimentares.

Pribul et al. (2011) com um *pool* de 4 lactobacilos como bacteriocinas não encontraram a mesma ação benéfica, apenas 36,6% dos *Staphylococcus aureus* foram sensíveis a ação destes bioativos.

No entanto as alternativas propostas por Godoy-Santos et al. (2019) e Pribul et al. (2011) não foram estudadas para suplementação oral, que tem potencial para facilitar o manejo.

Os *Lactobacillus* spp. são bactérias Gram-Positivas (Tabela 3) e normalmente produzem efeitos positivos para o hospedeiro, no entanto o processamento térmico tem como função diminuir a incidência destes e outros microrganismos.

Tabela 3: Percentual da contagem de *Lactobacillus* spp. compreendidos entre 0 UFC/mL, 0,5-10 UFC/ML, 10,5-100 UFC/mL e mis de 100 UFC/ mL em amostras de leite de vacas tratados com simbióticos, probióticos e controle no D0, D30 e D60.

| | D0 | | | | D30 | | | | D60 | | | |
|----------|---------------------|---------------------|----------|------|-------|-------------------|----------|------|--------------------|--------------------|----------|--------|
| | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 |
| SIM | 75% ^a | 0,0% ^b | 25% | 0,0% | 50% | 50% ^a | 0,0% | 0,0% | 100% ^a | 0,0% ^b | 0,0% | 0,0% |
| PRO | 62,5% ^{ab} | 37,5% ^{ab} | 0,0% | 0,0% | 87,5% | 0,0% ^b | 12,5% | 0,0% | 37,5% ^b | 62,5% ^a | 0,0% | 0,0% |
| Controle | 25% ^b | 62,% ^a | 12,5% | 0,0% | 75% | 25% ^{ab} | 0,0% | 0,0% | 37,5% ^b | 50% ^a | 0,0% | 12,50% |

Letras minúsculas significa diferença de 50% entre colunas.

O grupo SIM iniciou o experimento com quantidade significativamente superior na ausência de contagem de *Lactobacillus* spp comparado ao grupo controle, porém, ainda no grupo SIM, a quantidade foi diminuindo gradativamente a contagem de *Lactobacillus* spp e no D60 o grupos SIM mostrou uma diminuição significativa comparado aos grupos PRO e controle . É importante destacar que o grupo controle teve 12,5% das amostras com contagem superior a 100 UFC/mL no D60, porém isso pode não ter relação com a não suplementação dos aditivos.

Koryszewska-Baginska et al. (2019) salientam que os *Lactobacillus* presentes no leite cru podem conter propriedades probióticas, os autores também destacam a necessidade de mais pesquisas sobre o assunto.

Os fungos também podem ser um importante agente causador de doenças, na Tabela 5 vemos a percentual da contagem de fungos por amostras de leite.

Tabela 5: Percentual da contagem de fungos compreendidos entre 0UFC/mL, 0,5-10 UFC/mL, 10,5-100 UFC/ML e mais de 100 UFC/mL em amostras de leite de vacas tratados com simbióticos, probióticos e controle no D0, D30 e D60.

| | D0 | | | | D30 | | | | D60 | | | |
|----------|------|--------|----------|------|-------|--------|----------|------|-------|--------|----------|-------|
| | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 | 0 | 0,5-10 | 10,5-100 | >100 |
| SIM | 0,0% | 87,5% | 12,5% | 0,0% | 0,0% | 100% | 0,0% | 0,0% | 62,5% | 25% | 12,5% | 0,0% |
| PRO | 0,0% | 100% | 0,0% | 0,0% | 12,5% | 75% | 12,5% | 0,0% | 50% | 50% | 0,0% | 0,0% |
| Controle | 0,0% | 87,5% | 12,5% | 0,0% | 25% | 75% | 0,0% | 0,0% | 50% | 37,5% | 0,0% | 12,5% |

Letras minúsculas significa diferença de 50% entre colunas.

Não foram observadas diferenças significativas de contagens entre os grupos, porém, foi observado que o percentual da contagem de fungos do grupo SIM foi alta, no D0 e D30, onde todas

as amostras foram positivas para presença de fungos, no entanto, no D60 foi observado 62,5% das amostras com contagem de nenhuma colônia de fungos. Observa-se também uma diminuição nas demais contagem neste grupo, podendo ser um indicador de controle de fungos, embora não apresentou diferenças de 50% em relação aos outros grupos.

O grupo PRO apresenta resultados semelhantes ao SIM, onde no D0 todas as amostras continham presença de fungos, 12,5% no D30 e 50% no D60, mostrando uma diminuição gradativa. Porém, no D30 é possível observar um aumento da contagem de 10,5 a 100 UFC no grupo PRO.

O grupo controle também teve um aumento gradativo no percentual de ausência de UFC, no entanto foi o único grupo que teve mais de 100 UFC (12,5%) de fungos.

Coutinho et al. (2012), ressaltam que os fungos também trazem prejuízos econômicos para a pecuária leiteira e devem procurar alternativas viáveis para diminuição destes patógenos.

Alguns fungos, como por exemplo, os do gênero *Candida* também preocupam o desenvolvimento da atividade leiteira (SARTORI, SANTOS e MARIN, 2012).

De acordo com Rossoni et al. (2017), os probióticos têm sido descritos como uma estratégia potencial para controlar infecções oportunistas devido à sua capacidade de estimular o sistema imunológico.

Aldarvis (2013) relatou a inibição *in vitro* de *Candida* ssp. por microrganismos probióticos, segunda a mesma autora a inibição de *Candida* ocorre através de múltiplos fatores que podem variar de acordo com as espécies de *Lactobacillus* e *Candida* presentes.

Santos (2018) observou que os probióticos foram capazes de inibir a formação de biofilme *in vitro* e o desenvolvimento de candidose causados por *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Barros et al. (2018) verificaram a influência das interações entre microorganismos para identificar uma linhagem de *Lactobacillus* que poderia reduzir a filamentação de *Candida albicans* ATCC 18804 usando modelos *in vitro* e *in vivo*.

No presente experimento nos grupos de animais que receberam probióticos e simbióticos na dieta, foi observado uma diminuição no percentual da contagem de fungos no final do experimento.

O prebiótico utilizado no experimento é composto de beta-glucano, produto extraído e purificado da parede celular do fungo *Saccharomyces cerevisiae*, agindo como antígeno e imunomodulador, podendo proteger da ação de outros fungos patógenos.

Segundo Mendes et al. (2010), os beta-glucanos, ao modularem a resposta imunológica, preparam melhor os animais aos desafios sanitários.

A multiresistência é um dos maiores problemas em saúde única, Queiroz et al. (2011) destacam que novos antibióticos devem ser desenvolvidos para auxiliar a resolução deste problema. Probióticos

e prebióticos por serem imunomoduladores podem ser alternativas para a multirresistência a antibióticos.

Verificamos que as amostras contendo isolados de *Staphylococcus* spp. não mostraram nenhuma resistência aos antimicrobianos testados (Tabela 6).

Tabela 6: Perfil de sensibilidade bacteriana de *Staphylococcus* spp. em amostras de leite de vacas tratadas com simbióticos, probióticos e grupo controle no D0, D30 e D60.

| | | Nº* | COM | OXA | PEN | CIP | CLO | CLI | GEN | VAN | ERI | TET | RIF | SUT |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| D0 | PRO | 13 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | SIM | 23 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| D30 | PRO | 17 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | SIM | 9 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| D60 | Controle | 14 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | Controle | 15 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |
| | SIM | 23 | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S |

Resistência bacteriana a diferentes antibióticos.

Nº* Número do animal.

Não fica evidente a influência dos tratamentos com SIM e PRO para melhoria na sensibilidade a antibióticos.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com Armas, Camperio e Marianelli (2017) e Kappeli et al. (2019), que observam alta susceptibilidade de bactérias gram-positivas a vários antibióticos testados.

As bactérias gram-negativas são estruturas mais complexas e de mais difícil ação de antimicrobianos, na tabela 7 podemos observar que apenas uma das amostras de leite que encontrou bacilos gram-negativos não apresentou nenhuma resistência (Tabela 7).

Tabela 7: Perfil de sensibilidade de bactérias Gram-Negativas de amostras de leite de vacas tratadas com simbióticos, probióticos e grupo controle no D0, D30 e D60.

| | | Nº* | CIP | AMI | GEN | MER | CAZ | CRX | CFO | CPM | AMP | AMC | SUT | CFL |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| D0 | SIM | 1 | S | S | S | S | S | R | I | S | S | S | I | R |
| | PRO | 5 | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R |
| | Controle | 14 | S | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| | Controle | 15 | S | S | S | S | S | R | R | S | R | S | R | R |
| D60 | SIM | 1 | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S |
| | SIM | 7 | S | S | S | S | R | I | S | S | I | S | S | R |

Resistência bacteriana a diferentes antibióticos.

Nº* Número do animal.

Observa-se que muitas bactérias Gram-Negativas apresentam multirresistência, Sobur et al. (2019) mostram que em pelo menos 2 em 27 amostras de leite a *Escherichia coli* apresentou

resistência aos antimicrobianos, com destaque para gentamicina que obteve apenas duas amostras (7,41%) de resistência. Resultados semelhantes ao do presente trabalho, que aponta que a gentamicina foi um dos antibióticos que apresentou menor índice de resistência, ao lado de ciprofloxacina, amicacina, meropenem, cefepime, amoxicilina+clavulanato, com 1 resistência em 6 amostras.

Não é possível observar influência dos tratamentos para melhora nos índices de resistência a antimicrobianos.

Pires e Ribeiro (2006) Destacam que a ação de antibióticos em bactérias Gram-Positivas é simplificada em relação a bactérias Gram-Negativas, isso acontece devido a existência de uma camada que protege a bactéria Gram-Negativa da ação dos antimicrobianos, esta camada não existe em bactérias Gram-Positivas.

Segundo Krumperman (1983) amostras com índices de multirresistência (MAR) superiores a 0,2 (ou 20%) podem ser considerados de alto risco. O presente estudo aponta que duas das 6 amostras de leite que apresenta bacilos gram-negativos podem ser considerados de alto risco (Tabela 8).

Tabela 8: Índice de multirresistência a antibióticos de amostras de leite de vacas tratadas com simbióticos, probióticos e grupo controle nos dias 0, 30 e 60.

| | | MAR | %MAR |
|-----|----------|-------|---------|
| D0 | SIM | 0.167 | 16.67% |
| | PRO | 1 | 100.00% |
| | Controle | 0 | - |
| | Controle | 0.417 | 41.67% |
| D60 | SIM | 0.083 | 8.33% |
| | SIM | 0.167 | 16.67% |

MAR: Índice de multirresistência; %MAR= MAR multiplicado por 100.

Os resultados apontam a seriedade do problema de multirresistência, no entanto não é possível encontrar influência dos tratamentos nos resultados obtidos.

Foram identificados bacilos gram-negativos, *Proteus biogrupo 1*, *Klebsiela oxytoca* e *Escherichia coli* (Tabela 9).

Tabela 9: Identificação de bactérias de amostras de leite de vacas tratadas com simbióticos, probióticos e grupo controle nos dias 0, 30 e 60.

| | | Número da vaca | Identificação |
|-----|----------|----------------|--------------------------|
| D0 | SIM | 1 | BGN não fermentados |
| | PRO | 5 | <i>Proteus biogruppo</i> |
| | Controle | 14 | <i>Klebsella oxytoca</i> |
| | Controle | 15 | <i>Proteusbiogruppo</i> |
| D60 | SIM | 1 | <i>Escherichia coli</i> |
| | SIM | 7 | BGN não fermentados |

BGN= Bacilo Gram-Negativo.

Os tratamentos com PRO e SIM não demonstram surtir efeito no perfil de bactérias identificadas no leite. No entanto, apenas o grupo SIM mostrou identificação no D60.

Klibi et al. (2019), em um experimento na Tunísia, apontam que nas amostras de leite existem grande quantidade de bactérias Gram-negativas, independente da região ou época do ano.

No presente trabalho foi identificado uma bactéria de *Escherichia coli* (16,67%), Klibi et al. (2019) observaram 29,67% em 300 amostras, número um pouco superior aos observados nesta pesquisa. Os autores também encontraram em 10% das amostras *Klebsella pneumoniae*, porém é importante destacar que mesmo se tratando do mesmo gênero esse isolado é de outra espécie.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora não foi possível observar diferença significativa no comportamento da contagem de UFC/mL em Gram-Negativos, *Staphylococcus* spp. e fungos, no uso de suplementação oral de simbióticos e probióticos, é possível observar uma diminuição percentual na contagem de fungos, fato esse que pode incentivar novas pesquisas sobre o assunto. Por outro lado os simbióticos diminuíram a contagem de *Lactobacillus* spp. Conclui-se também que os tratamentos com probióticos e a simbiose de probióticos com prebióticos não alteraram a sensibilidade a antibióticos.

REFERÊNCIAS

ALDARVIS, J. D. G. **Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida* spp. Isolados de usuários de próteses totais.** 2013. Dissertação Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ARMAS, F.; CAMPEIRO, C.; MARIANELLI, C. *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminants mastitis-causing pathogens. **Plos One.** v. 9, p. 1 – 13. Jan, 2017.

- CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals.** 4 ed. Wayne: Approved Standard VET01-A4.CLSI, 2013.
- COUTINHO, L. C. A. et al. Eficácia *in vitro* de desinfetantes utilizados na anti-sepsia dos tetos frente a leveduras isoladas do leite de vacas com mastite. **Pesq. Vet. Bras.** v. 32, n. 1, p. 61 – 65. Jan, 2012.
- DE BARROS, P. P. et al. *Lactobacillus paracasei* 28.4 reduces in vitro hyphae formation of *Candida albicans* and prevents the filamentation in an experimental model of Caenorhabditis elegans. **Microb. Pathog.**, v. 117, p. 80-87, 2018.
- DEMEU, F. A. et al. Influência do descarte involuntário de matrizes no impacto econômico da mastite em rebanhos leiteiros. **Ciênc. Agrotec.** v. 35, n. 1, p. 195 – 202. Jan/Fev, 2011.
- DIMITRELLOU, D. et al. Effect of milk type on the microbiological, physicochemical and sensory characteristics of probiotic fermented milk. **Microorganisms.** v. 7, n. 9, p. 1 – 8. Ago, 2019.
- FUENZALIDA, M. J.; RUEGG, P. L. Negatively controlled randomized clinical trial to evaluate intramammary treatment of nonsevere, gram-negative clinical mastitis. **J. Dairy Sci.** v. 102, n. 6, p. 1 – 20. Jun, 2019.
- GODOY-SANTOS, F. et al. Efficacy of a ruminal bacteriocin against pure and mixed cultures of bovine mastitis pathogens. **Indian J. Microbiol.** v. 59, n. 3, p. 304 – 312. Set, 2019.
- KAPPELI, N. et al. Sequence types and antimicrobial resistance profiles os *Streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. **Front. Vet. Sci.** v. 6, p. 1 – 7. Jul, 2019.
- KLIBI, A. et al. Epidemiology of β -lactamase-producing Staphylococci and gram negative bacteria as cause of clinical bovine mastitis in Tunisia. **Biomed Res. Int.** Ago, 2019.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. **Diagnóstico microbiológico/Microbiological diagnoses: texto y atlas em color/test and color atlas.** Buenos Aires: Médica Panamericana, 2008.
- KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 46, n. 1, p. 165 – 170. Jul, 1983.
- LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES F. P. e ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4.ed, Washington, DC American Public Health Association. p. 387 – 400, 2001, 676.
- LANGONI, H. et al. Cultivo microbiológico e a sensibilidade no isolamento de patógenos nas mastites bovinas. **Vet e Zootec.** v. 16, n. 4, p. 708 – 715. Dez, 2009.
- LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência da mastite bovina. **Pesq. Vet. Bras.** v. 33, n. 5, p. 620 – 626. Maio, 2013.
- MENDES C. B. S. *et al.* Suplementação de betaglucano a dietas de leitões de 21 a 60 dias de idade. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.62, n.3, p.696-705, 2010.

MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association (APHA), p. 63 – 67, 2001. 676p.

PELLEGRINE, M. et al. Bovine mastitis prevention: humoral and cellular response of dairy cows inoculated with lactic acid bacteria at the dry-off period. **Benef. Microbes**. v. 8, n. 4, p. 589 – 596. Ago, 2017.

PRIBUL, B. R. et al. Resistência bacteriana e ação de bacteriocinas de *Lactobacillus* spp em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 63, n. 3, p. 744 – 748. Jun, 2011.

QUEIROZ, G. M. et al. Multirresistência bacteriana e opções terapêuticas disponíveis. **Rev. Bras. Clin. Med**. v. 10, n. 2, p. 132 – 138. Mar/Abr, 2012.

RAJAMANICKAM, K.; YANG, J.; SAKHARKAR, M. K. Phytochemicals as alternatives to antibiotics against major pathogens involved in bovine respiratory disease (BRD) and bovine mastitis (BM). **Bioinformation**. v. 15, n.1, p. 32 – 35. Fev, 2019.

ROSSONI R. D. et al. Antifungal activity of clinical *Lactobacillus* strains against *Candida albicans* biofilms: identification of potential probiotic candidates to prevent oral candidiasis. **Biofouling**, n.34, v2, p.212-25, 2018.

SAIDI, R. et al. Antibiotic susceptibility of *Staphylococci* isolated from bovine mastitis in Algeria. **J. Adv. Vet. Anim. Res**. v. 6, n. 2, p. 231 – 235. Jun, 2019.

SANTOS, R. B. Avaliação dos efeitos probióticos de cepas clínicas de *Lactobacillus* spp. Sobre diferentes espécies de *Candida*. 2018. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), São José dos Campos, 2018.

SARTORI, L. C. A.; SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente a *Candida spp* isolada de leite mastítico bovino. **Ars Veterinária**. v. 28, n. 4, p. 240 – 243. Out/Dez, 2012.

SCHUCH, L. F. D. et al. Cinética da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. **Revista ciência animal brasileira**. v. 9, n. 1, p. 161 – 169. Jan/Mar, 2008.

SILVA, D. R. et al. Redução da carga bacteriana total após a utilização de desinfetantes em ordenha mecânica no hospital veterinário da Unipar em diferentes períodos. **Enciclopédia Biosfera**. v.9, n. 16, p. 2975-2974. Jul, 2013.

SILVA, V. S. et al. Beta-glucano solúvel intramamário no controle de mastites subclínicas. **Enciclopédia Biosfera**. v. 15, n. 28, p. 194 – 200. Mar, 2018.

SOBUR, A. et al. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* associated with dairy cattle and farm environment having public health significance. **Veterinary World**. v. 12, n. 7, 984 – 993. Jul, 2019.

SOUZA, R. F. S. et al. *Lactobacillus casei* BL23 modulates the innate immune response in *Staphylococcus aureus*-stimulated bovine mammary epithelial cells. **Benef. Microbes.** v. 9, n. 6, p. 985 – 995. Jul, 2018.

MORAES, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de Ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP, p. 539 570, 2006. 583p.

VALIM, V. M. et al. Melhoria da qualidade do leite a partir da implantação de boas práticas de higiene na ordenha em 19 municípios na região central do Paraná. **Semina: ciências agrárias.** v. 30, n. 1, p. 181-188. Jan, 2009.