

Avaliação bacteriológica do lavado traqueobrônquico de bezerros saudáveis e com broncopneumonia criados no Estado de São Paulo, Brasil – dados preliminares

N. C. Gaeta¹, B. L. M. Ribeiro¹, J. A. Marques¹, M. A. R. Alemán¹, E. C. Marques¹, B. A. F. D. Oliveira¹, A. F. C. Nassar², E. Yoshihara³, J. Timenetsky⁴, L. Gregory^{1*}

¹ Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

² Laboratório de Bacteriologia Geral, Instituto Biológico, São Paulo, Brasil

³ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Departamento de Descentralização do Desenvolvimento, Presidente Prudente, São Paulo, Brasil

⁴ Laboratório de Micoplasmas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
lgregory@usp.br

(Recebido em 03 de outubro de 2014; aceito em 20 de outubro de 2014)

Doenças respiratórias são uma das enfermidades que mais acometem os bezerros, e têm como principais microrganismos encontrados a *Manheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar 60 bezerros (sadios e doentes) de Bragança Paulista e Presidente Prudente, São Paulo, por meio de exame clínico e coleta de lavado traqueobrônquico, para estudar as principais bactérias isoladas em quadros de broncopneumonia. Observou-se uma frequência de isolamento de 42% *Bacillus* spp., 25% de *Staphylococcus intermedius*, 7% *Streptococcus* spp., 7% Enterobactérias, 5% de *Escherichia coli*, 3% *Enterobacter cloacae*, 2% *Serratia rubidaea*, 2% *Pantoea agglomerans*, 2% *Enterobacter aerogenes*, 2% Bactérias não fermentadoras, havendo ausência de isolamento de *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*. Para os micoplasmas, a taxa de isolamento foi 5%, com identificação de *M. dispar* em 14,8 % e ausência de amplificação para *M. mycoides*, *subsp. mycoides* SC, em 27 amostras identificadas por PCR. Com estes resultados preliminares foi possível concluir que o *M. dispar* pode ser um agente importante no aparecimento de casos de broncopneumonia em bovinos de acordo com relatos de outros autores. Os resultados obtidos acima sugerem uma possível contaminação da amostra devido à inalação destas bactérias que estavam presentes no meio ambiente, pois a colheita foi asséptica.

Palavras-chave: bovinos, microbiologia e doenças respiratórias.

Bacteriological evaluation of tracheobronchial wash of healthy calves and calves with bronchopneumonia raised in the State of São Paulo, Brazil - preliminary data

Respiratory diseases are one of the illnesses that most affect the calves, which main microorganisms found are *Manheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma* spp. The aim of this study was to evaluate 60 calves (healthy and diseased) of Bragança Paulista and Presidente Prudente, SP, by clinical examination and collection of tracheobronchial wash, studying the most frequently isolated bacteria in cases of bronchopneumonia. We observed a frequency of isolation of 42% *Bacillus* spp, 25% for *Staphylococcus intermedius*, 7% *Streptococcus* spp, 7% Enterobactérias, 5% *Escherichia coli*, 3% *Enterobacter cloacae*, 2% *Serratia rubidaea*, 2% *Pantoea agglomerans*, 2% *Enterobacter aerogenes*, and 2% non-fermentative bacteria. There was no isolation for *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. For mycoplasmas, the isolation rate was 5%, with identification of *M. dispar* in 14,8 % and no of amplification for *M. mycoides*, *subsp. mycoides* SC, in 27 samples by PCR. With these preliminary results, it was concluded that *M. dispar* may be an important agent in appearance of cases of pneumonia in cattle, according to reports by other authors. The results above suggest a possible contamination of the sample due to the inhalation of these bacteria, which were present in the environment, as collect of the samples were aseptically.

Keywords: bovines, microbiology and respiratory disease.

1. INTRODUÇÃO

Doenças respiratórias são consideradas um problema de sanidade, levando a altos índices de morbidade e mortalidade e a sérios problemas de cunho econômico. Em bovinos, os principais microrganismos encontrados em pneumonias de origem infecciosa são *Manheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* spp., estando frequentemente associados a vírus tais como Vírus da Diarreia Viral Bovina, Vírus Respiratório Sincicial Bovino, Vírus Parainfluenza tipo 3 e Herpes vírus Bovino^{7,10,14}.

No gado, *M. haemolytica* e *P. multocida* estão entre os patógenos primários do complexo de doenças respiratórias (BRD), incluindo a pneumonia enzoótica neonatal. *P. multocida*, em muitos casos, coloniza o trato respiratório anterior do gado saudável, em relação de comensalismo. No entanto, pode também invadir o trato respiratório posterior, causando dessa forma a pasteurelose pneumônica⁷.

Porém, até o momento, grande parte dos estudos relata o panorama europeu e da América do Norte. O impacto da manheimiose bovina é pouco conhecido na América Latina. No Brasil, existem estudos da ocorrência de *P. multocida* e *M. haemolytica* em ovinos². Em bezerros, por meio de lavado traqueobrônquico, é relatado em estudo recente a presença de *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias³.

Sabendo da escassez de estudos brasileiros que comprovem a presença destas bactérias na microbiota do trato respiratório de bovinos, principalmente quando da utilização do lavado traqueobrônquico como amostra clínica, o objetivo deste trabalho foi avaliar bezerros da região sudeste brasileira (Bragança Paulista e Presidente Prudente - SP), por meio de exame clínico e coleta de lavado traqueobrônquico, a fim de buscar os principais microrganismos isolados em quadros de broncopneumonia, comparando os achados entre animais saudáveis e doentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Animais: foram selecionados 60 bezerros entre dois e 12 meses de idade, de 10 propriedades, sendo uma localizada em Bragança Paulista e nove em Presidente Prudente, região Sudeste do Brasil. Os animais foram avaliados por exame físico geral (escore corporal, hidratação, atitude geral, temperatura corpórea, frequência respiratória, frequência cardíaca, tempo de preenchimento capilar, coloração de mucosas) e específico do sistema respiratório (simetria do fluxo de ar, odor nasal, presença e tipo de secreção, tipo de movimentos respiratórios, auscultação e percussão dos quadrantes torácicos). Foram considerados doentes, os animais que apresentaram pelo menos duas das seis manifestações clínicas a seguir: temperatura retal acima de 39,5°C, secreção nasal mucopurulenta ou purulenta, tosse, reflexo de tosse positivo (pela compressão dos primeiros anéis traqueais), estertoração e/ou crepitação na auscultação pulmonar e aumento da frequência respiratória acima de 40 movimentos respiratórios/minutos³.

Amostras: com o animal em estação, realizou-se tricotomia da região do terço médio do pescoço, com posterior antisepsia utilizando álcool 70°, clorexidina e iodopovidona (Figura 1a). Em seguida, coletou-se o lavado traqueobrônquico por traqueocentese, no qual se introduziu uma sonda do tipo Intracath (BD, USA) até a região brônquica, como demonstrado na figura 1b.



Figura 1: (a) Contenção e antissepsia da traqueia e (b) introdução da sonda tipo Intracath por traqueocentese

Foram instilados 20 mL de solução fisiológica estéril, obtendo-se o lavado por aspiração imediata com seringa plástica de 60 mL (Figura 2). A amostra obtida foi dividida em alíquotas, sendo uma acondicionada em meio de transporte Stuart refrigerado, para bacteriologia geral, e outra acondicionada em criotubo contendo glicerol e meio de transporte para micoplasmas, sendo, posteriormente, acondicionada em nitrogênio líquido.



Figura 3: Lavado traqueobrônquico

Cultivo: As amostras foram enviadas em até 24 horas após a coleta (quando realizada em Bragança Paulista) e após sete dias (quando realizada em Presidente Prudente) ao Laboratório de Bacteriologia e Micologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram processadas seguindo o protocolo para isolamento de *Manheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida*¹⁵. Para o isolamento de *Mycoplasma* spp., as amostras foram cultivadas em meio SP4, seguindo o protocolo¹⁶ com posterior realização de PCR para identificação da espécie com utilização de oligonucleotídeos previamente descritos na literatura¹², no laboratório de Micoplasmas, no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB), da Universidade de São Paulo.

Análise Estatística: A correlação entre o isolamento bacteriano e a presença ou ausência de broncopneumonia foi realizada através do teste chi-quadrado e teste exato de Fisher, utilizando o software SPSS (Statistical Package for Social Sciences) v.20 (IBM, USA), considerando um nível de confiança $\geq 95\%$ ($p \leq 0,05$),

3. RESULTADOS

Avaliou-se 27 bezerros sadios e 33 doentes, com idades variando entre 2 a 12 meses. Após a pesquisa bacteriológica por cultivo, 42% *Bacillus* spp., 25% de *Staphylococcus intermedius*, 7% *Streptococcus* spp., 7% Enterobactérias, 5% de *Escherichia coli*, 3% *Enterobacter cloacae*, 2% *Serratia rubidae*, 2% *Pantoea agglomerans*, 2% *Enterobacter aerogenes*, 2% Bactérias não fermentadoras. Não houve isolamento de *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* (Figura 3).

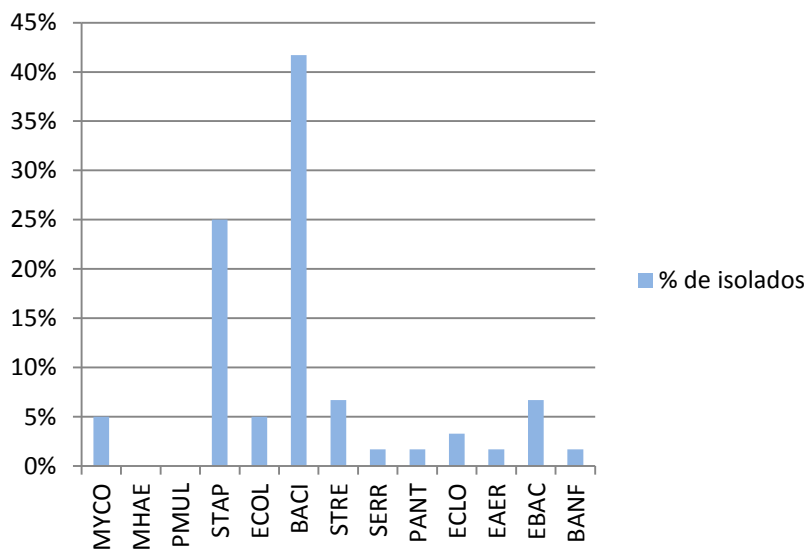


Figura 3: Frequência de isolamento bacteriano: MYCO- *Mycoplasma* spp.; MHAE - *Mannheimia haemolytica*; PMUL- *Pasteurella multocida*; STAP- *Staphylococcus* sp.; ECOL - *Escherichia coli*; BACI - *Bacillus* sp.; STRE - *Streptococcus* sp.; SERR - *Serratia rubidae*; PANT- *Pantoea agglomerans*; ECLO- *Enterobacter cloacae*; EAER-*Enterobacter aerogenes*; EBAC- Enterobactérias; BANF- Bactéria gram - não fermentadora

Para os micoplasmas, encontrou-se uma frequência de isolamento de 5% (Figura 4), sendo um animal doente e 2 sadios. Após a identificação pela reação de polimerase em cadeia (PCR) para 27 amostras, verificou-se uma frequência de 14,8% para *M. dispar* e ausência de amplificadas para *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC.

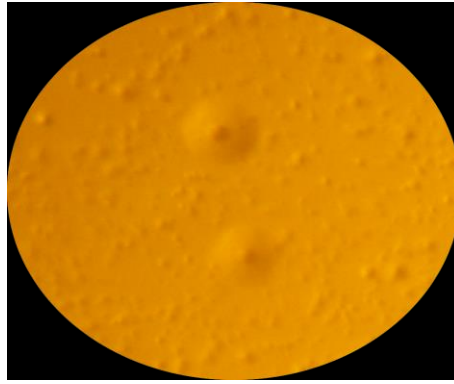


Figura 4: Colônias de *Mycoplasma* spp.- aspecto de “ovo frito”

Não se constatou evidências de que haja correlação” entre as bactérias isoladas e quadro de broncopneumonia, exceto na comparação com *Bacillus* spp., onde foi encontrada uma possível tendência ($p=0,087$), a qual pode ser confirmada após a coleta de mais amostras, como mostrou o teste do valor de resíduo ajustado.

4. DISCUSSÃO

Pasteurella multocida e *M. haemolytica* não foram identificados nesta pesquisa, concordando com Benesi et al.³. Em estudos realizados na Europa e na América do Norte, é citada grande prevalência de *Pasteurella multocida* e *M. haemolytica*, tanto no trato nasal de bezerros sãos e doentes, como isolados em pneumonias fatais de bovinos adultos, sendo um dos patógenos mais frequentemente associados a quadros respiratórios^{8,11}. Entretanto, faltam estudos brasileiros que comprovem a presença destas bactérias na microbiota do trato respiratório de bovinos, principalmente quando da utilização do lavado traqueobrônquico como amostra clínica. Os relatos de isolamento destas bactérias ocorreram quando da utilização de swab nasal e orofaríngeo¹⁵. E tecido pulmonar e traqueal de bezerros⁴ como amostra clínica. A continuidade do estudo é imprescindível para se confirmar a importância dessas bactérias nas enfermidades do trato respiratório de bovinos.

Observou-se, também, grande quantidade de enterobactérias na microbiota traqueobrônquica dos animais, estando em concordância com a literatura nacional^{3,6,9}. Isto pode ser explicado pela diferença no manejo dos animais avaliados quando comparamos o manejo dos animais citados na literatura internacional. Em nove propriedades visitadas, há proximidade de um animal com o outro, havendo poucos bezerros separados por gaiolas individuais, além de apresentarem frequentes quadros diarreicos. Pelo contato oro nasal e por aspiração de material fecal, os bezerros podem adquirir esta microbiota classificada como transitória³.

Obteve-se isolamento de *Mycoplasma* spp. em 5% das amostras, não havendo diferenças estatísticas entre os dois grupos estudados. Sabe-se que, apesar de o cultivo ser a técnica capaz de certificar a presença do microrganismo viável, vieses como contaminação por bactérias oportunistas e tempo decorrido entre coleta e processamento laboratorial, tornam a técnica incerta⁵.

Agen et al.¹ ao estudar a microbiota presente no lavado broncoalveolar de bovinos, verificou que houve uma alta porcentagem de amostras positivas para todas as bactérias estudadas, tanto no grupo sadio quanto no doente, sendo que diferenças estatísticas foram encontradas para *M. dispar* e *M. bovirhinis*, diferindo do presente trabalho.

Não foi observado diferença entre a prevalência dos microrganismos na microbiota de bezerros sãos e doentes, concordando com Benesi et al.³. No entanto, pelo p-value próximo a 0,05 ($p=0,087$), há indícios de que com o aumento de número de amostras, será possível identificar certa tendência entre *Bacillus* spp. e o quadro de broncopneumonia, sendo esta bactéria encontrada em 15 animais doentes (15/33) e em 6 (6/27) animais sadios. Segundo Murray et al.¹³, os microrganismos da

família *Enterobacteriaceae* e *Bacillus* são mais isolados na presença de doença respiratória característica.

5. CONCLUSÃO

Não houve isolamento de *Pasteurella multocida* e *Manheimia haemolytica* dos bezerros estudados. Isolou-se micoplasmas tanto em animais doentes quanto em sadios. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre a microbiota traqueobrônquica de animais sadios e com quadro de broncopneumonia. Portanto, mais estudos devem ser realizados a fim de ampliar a procura por outros agentes causadores de broncopneumonia, como por exemplo, os virais e parasitários.

6. AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

-
1. Angen O, Thomsen J, Larsen LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PMH, Enemark, JMD. Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet Microbiol.* 2009; 137(1-2): 165-71.
 2. Bridger PS, Bauerfeind R, Wenzel L, Bauer N, Menge C, Thiel H-J, Reinacher M, Doll K. Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011; 141(1-2): 1-10.
 3. Benesi FJ, Bertagnon HG, Wachholz L, Leal MLR, Fernandes WR, Benites NR, Melville PA. Microbiota bacteriana e citologia da região traqueobrônquica de bezerros no período neonatal. *Pesq. Vet. Bras.* 2013; 33(6): 700-4.
 4. Cardoso MV, Sforzin AJ, Scarcelli E, Teixeira SR, Miyashiro S, Campos FR, Genovez, ME. Importância do diagnóstico diferencial em um surto de pneumonia enzoótica bovina. *Arq. Inst. Biol.* 2002; 69(3): 111-113.
 5. Cardoso MV, Teixeira SR, Miyashiro S, Vasconcelos SA, Gregory L, Genovez ME. Estudo comparativo entre técnicas de isolamento e PCR para detecção de *Mycoplasma* e *Ureaplasma diversum* em muco prepucial e sêmen *in natura* de touros de monta natural e central de inseminação artificial. 2006; 73(1): 33-40.
 6. Coutinho ADS, Paes J, Filho DO, Pessoa D, Silva G, Oliveira AP De, Marcondes, JS, Chiacchio SB, Paes AC, Siqueira AK, Amorim RM, Gonçalves, RC. Mannheimiose pulmonar experimental em bezerros : swab nasal e nasofaríngeano como auxílio diagnóstico. *Pesq. Vet. Bras.* 2009; 29(1): 83-88.
 7. De Jong A, Thomas V, Simjee S, Moyaert H, El Garch F, Maher K, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the Vet Path study. *Vet Microbiol .* 2014; 172(1-2): 202-215.
 8. Fulton RW, Blood KS, Panciera RJ, Payton ME, Ridpath JF, Confer AW, Saliki JT, Burge LT, Welsh RD, Johnson BJ, Reck A. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J Vet Diagn Invest.* 2009; 21(4): 464-477.
 9. Gonçalves RC. Estudo da flora traqueobrônquica em bezerros clinicamente sadios e portadores de pneumonia, na região de Botucatu, SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. 1987.
 10. Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010; 26(2): 381-394.
 11. Hotchkiss EJ, Dagleish MP, Willoughby K, McKendrick IJ, Finlayson J, Zadoks RN, Newsome E, Brulisauer F, Gunn GJ, Hodgson JC. Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. *Vet Rec* 2010; 167(15): 555-560.
 12. Lauerma LH. Mycoplasma PCR Assays. Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animals diseases. Alabama: Department of Agriculture and Industries; 1998:b41-47.
 13. Logan NA, Hoffmaster AR, Shadomy SV and Stauffer, KE. *Bacillus* and Other Aerobic Endospore-Forming Bacteria. In: Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover R H, editors. *Manual of clinical microbiology.* 7th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. pp. 381-402.

14. Radostits OM. Doenças Causadas por Riquetsias. In: Radostitis OM, Gaine CC, Blood DC, Hinchcliff KW. *Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos*. 9th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. p. 1132–46.
15. Viana L, Gonçalves RC, Oliveira Filho JP, Paes AC, Amorim RM. Ocorrência de *Mannheimia haemolytica* e de *Pasteurella multocida* em ovinos sadios e com enfermidade respiratória. *Arq. Bras. Med. Veterinária e Zootec.* 2007; 59(6): 1579-1582.
16. Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH. *In: Micoplasmosis in Animals: Laboratory Diagnosis*. 1994. Iowa Iowa State University Press. 1th ed. 173p.