PESQUISA DE *Klebsiella* sp EM BEZERROS BÚFALOS SADIOS OU COM ENFERMIDADE RESPIRATÓRIA

Beatriz Ferreira Barroso[1]

Cristiele Assunção Matão[2]

Caroline Lima Santos[3]

Ana Catarina Pinheiro Angelim Bezerra[4]

Luísa Araújo Piancó[5]

Helder de Moraes Pereira[6]

INTRODUÇÃO

A bubalinocultura tem assumido crescente relevância no contexto da produção animal brasileira, especialmente em regiões com condições ambientais limitantes à bovinocultura tradicional, como a Baixada Maranhense. O búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*), originalmente domesticado na Ásia, destaca-se por sua elevada adaptabilidade a ambientes úmidos, alagadiços e com forrageiras de baixa qualidade nutricional, características predominantes nessa microrregião do Maranhão. Essas condições favorecem a criação de bubalinos, uma vez que esses animais apresentam maior eficiência no aproveitamento de pastagens nativas e maior resistência a microrganismos quando comparados aos bovinos (IBGE, 2023; Neto *et al*, 2022).

No Brasil, o rebanho bubalino ultrapassa 1,5 milhão de animais, sendo o Maranhão um dos estados de maior representatividade, com significativa concentração de rebanhos na Baixada Maranhense. A atividade pos[1]sui importante papel socioeconômico, sobretudo para agricultores familiares e pequenos produtores, que frequentemente enfrentam limitações financeiras e estruturais para a manutenção da bovinocultura convencional. Nesse cenário, a criação de búfalos constitui uma alternativa produtiva viável e sustentável, contribuindo para a geração de renda e para o fortalecimento da economia local (ICMBio, 2022; Mason *et al*, 1977).

Apesar da reconhecida rusticidade dos bubalinos, esses animais não são imunes à ocorrência de enfermidades infecciosas. O sistema extensivo de criação predominante na região, associado ao contato frequente entre diferentes rebanhos, favorece a disseminação de agentes patogênicos. Entre os grupos mais susceptíveis destacam-se os bezerros bubalinos, devido à imaturidade do sistema imunológico, o que aumenta a vulnerabilidade a infecções respiratórias (Mahmoud *et al*, 2009).

As Doenças Respiratórias Bovinas (DRB) representam um dos principais desafios sanitários para a produção bubalina. Fatores ambientais, como elevada umidade, oscilações climáticas e estresse térmico, comprometem os mecanismos de defesa do trato respiratório e favorecem a instalação de agentes infecciosos. Embora essas enfermidades possam possuir etiologia viral, parasitária ou bacteriana, os agentes bacterianos oportunistas são os mais frequentemente associados aos quadros clínicos respiratórios (Damé, 2019; Neto *et al*, 2023).

1 Graduada em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: biabarroso1998@gmail.com
2 Discente em Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: cristielevet@gmail.com
3 Médica Veterinária, Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: caaarol.lima@gmail.com
4 Médica Veterinária, Mestranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: anacatarina402@gmail.com
5 Médica Veterinária, Doutoranda em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: luisapianco@hotmail.com
6 Médico Veterinário, Pós-Doutor em Ciência Animal, Docente do Departamento das Clínica de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão. E-mail: helderpereira@professor.uema.br

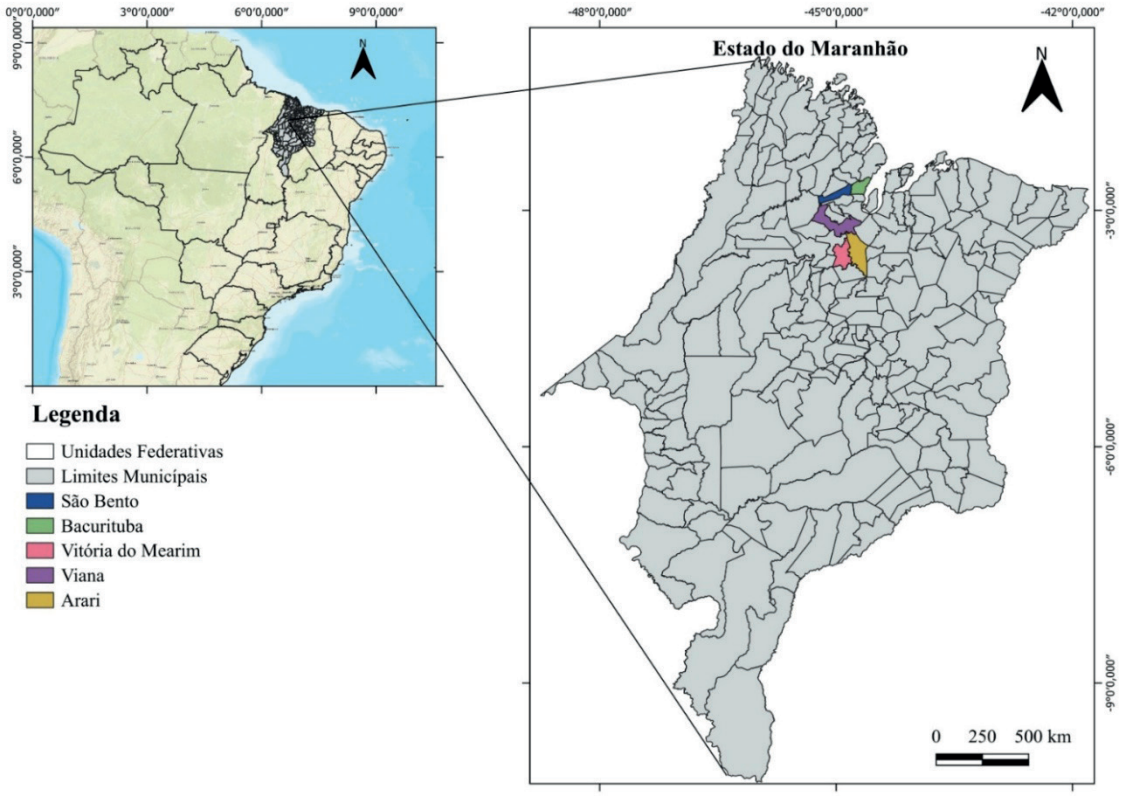
Dentre esses microrganismos, destaca-se a *Klebsiella* sp., bactéria Gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, amplamente distribuída no ambiente e presente na microbiota natural dos animais. Em condições de imunossupressão, esse agente pode proliferar de forma descontrolada, desencadeando infecções respiratórias, especialmente pneumonias. Dessa forma, estudos relacionados à microbiota respiratória dos bubalinos tornam-se fundamentais para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes, contribuindo para a sanidade animal e para a sustentabilidade da cadeia produtiva bubalina na Baixada Maranhense (Kumar *et al*, 2018; Youserya *et al*, 2022).

METODOLOGIA

Área do estudo

Os rebanhos pertenceram aos municípios de Arari, São Bento, Vitória do Mearim, Viana e Bacurituba, todos localizados na Baixada Maranhense.

Figura 1 – Mapa do Maranhão, com destaque para os municípios de Arari, São Bento, Vitória do Mearim, Viana e Bacurituba.



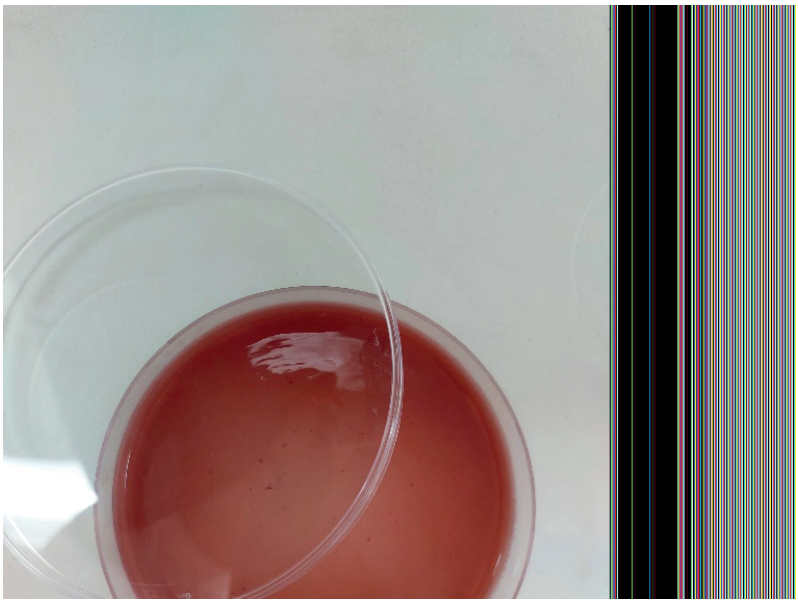
Fonte: IBGE. 2023. Elaboração: Cristiele Assunção Matão.

Coleta das amostras

Um total de 72 bezerros, de um dia de vida a 12 meses de idade, participaram da pesquisa. Todos esses animais foram submetidos a exame clínico: o geral e o específico do sistema respiratório. No exame geral foram avaliados o escore de condição corporal, presença ou ausência de ectoparasitas, foram aferidos os parâmetros fisiológicos de grau de desidratação, temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória, além da atitude geral do animal e a

coloração de suas mucosas. No exame do sistema respiratório foi avaliada a presença de secreção nasal e ocular, se presente qual a coloração e consistência, a auscultação pulmonar também foi realizada (Feitosa, 2022).

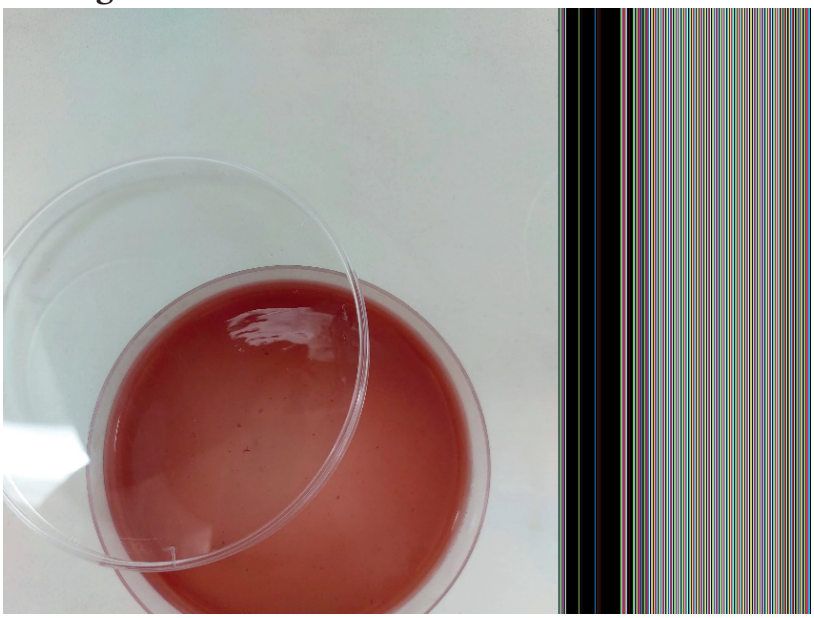
Figura 2 – Rebanho de bezerros bubalinos em curral.



Fonte: Autor, 2024.

O material utilizado para o cultivo microbiológico foi coletado de todos os bezerros examinados, independente de sua condição de saúde. Essas amostras foram coletadas por meio de *swab*, esse estava com a sua ponta de algodão imersa em caldo BHI (Brain-Heart Infusion) (Seker et al, 2010). O *swab* foi introduzido em ambas as narinas dos bezerros, conforme ilustrado na Figura 3. Após a coleta, a extremidade do *swab* foi colocada em tubos contendo caldo BHI. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo reciclável e mantidas sob refrigeração a uma temperatura entre 4°C e 8°C durante o transporte para o Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual do Maranhão, onde foram cultivadas

Figura 3 – Coleta de *swab* nasal de bezerro bubalino.

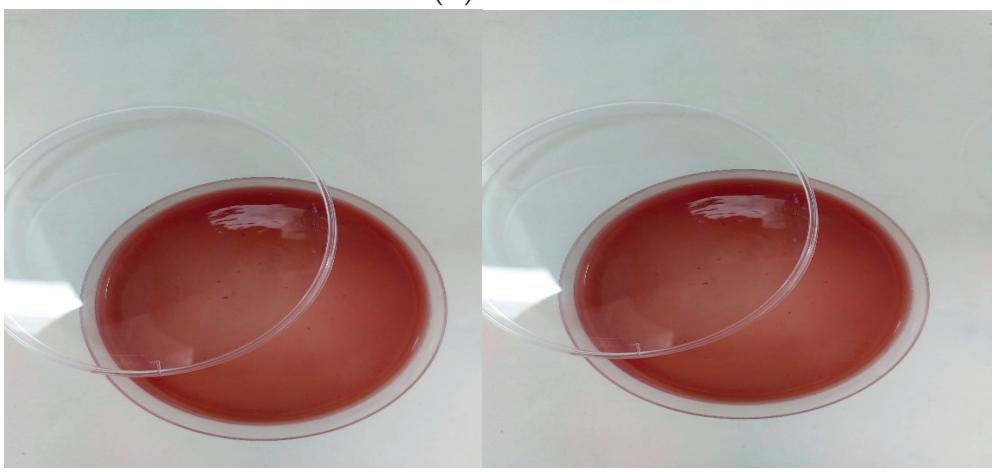


Fonte :Autor, 2024.

Isolamento bacteriano

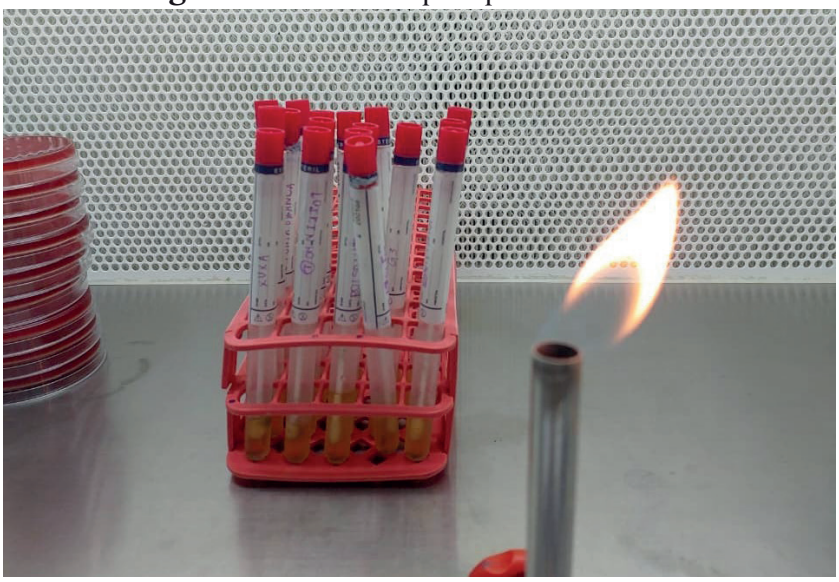
Em laboratório as amostras foram cultivadas em ágar sangue bovino 5% e em ágar MacConkey, que podem ser observadas na Figura 4, então levadas para estufa por um período de 24 horas a 36°C, decorrido o tempo foi feita a seleção dos crescimentos com características bacterianas. Essas colônias foram cultivadas mais uma vez em ágar sangue bovino 5%, por 24 horas a uma temperatura de 36°C, para crescerem de forma isolada.

Figura 4 – Placa de Petri com ágar sangue bovino 5% (A). Placa de Petri com ágar MacCconkey (B).



Fonte: Autor, 2024.

Figura 5 – Amostras para primeiro cultivo



Fonte: Autor, 2025.

Testes bioquímicos e identificação bacteriana

Com as colônias isoladas, foi feita a sua caracterização morfológica, sendo observado: coloração, brilho, textura, tamanho e se apresentava hemólise. Com a caracterização feita, foi então realizada a coloração de Gram, que consiste em fixar uma colônia do isolado em uma lâmina, utilizando soro fisiológico e uma fonte de calor. Após a fixação foi realizado a aplicação dos corantes, cristal de violeta, Lugol, do agente descorante e fucsina, nessa ordem e respeitando o tempo de aplicação de cada etapa. Em seguida, foi realizada a leitura das lâminas

em microscópio. Com a identificação das bactérias Gram-negativas, foram realizados os meios bioquímicos para a identificação do gênero bacteriano (Quinn et al, 2007). Uma amostra das colônias foi então inoculada nos meios bioquímicos, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Realização dos testes bioquímicos.



Fonte: Autor, 2024

Foram realizados testes que são utilizados para identificar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como Catalase, Oxidase, Urease, motilidade (SIM), teste de indol, Triplo Sugar Iron (TSI), Voges Proskauer (VP), manose e maltose; e testes que são realizados somente em bactérias Gram-negativas, que foram o Vermelho de Metila (VM), Lisina (LIA) e o Citrato de Sommons (Quinn et al, 2007). Os testes que precisavam ser incubados foram colocados em uma estufa a uma temperatura de 36°C por 24 horas e sua leitura foi realizada após esse tempo.

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada com base nas características da coloração de Gram e no perfil bioquímico obtido nos testes realizados. Os resultados observados foram comparados com os perfis esperados descritos na literatura especializada.

Confirmação por meio da técnica de espectrometria de massa

A confirmação foi realizada em parceria com o Qualileite-FMVZ-USP, Campus de Pirassununga, SP, fazendo utilização da técnica de espectrometria de massa. Os perfis proteicos foram obtidos em triplicata a partir de culturas bacterianas enviadas de Laboratório de Bacteriologia Clínica da UEMA. Sendo a extração das proteínas feita seguindo o protocolo de extração com etanol/ácido fórmico (Sauer et al., 2008; revisado por Freiwald & Sauer, 2009). Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro MALDI-TOF Autoflex III SmartBeam (Bruker Daltonics), operando em modo linear positivo com calibração externa pelo padrão Bacterial Test Standard.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

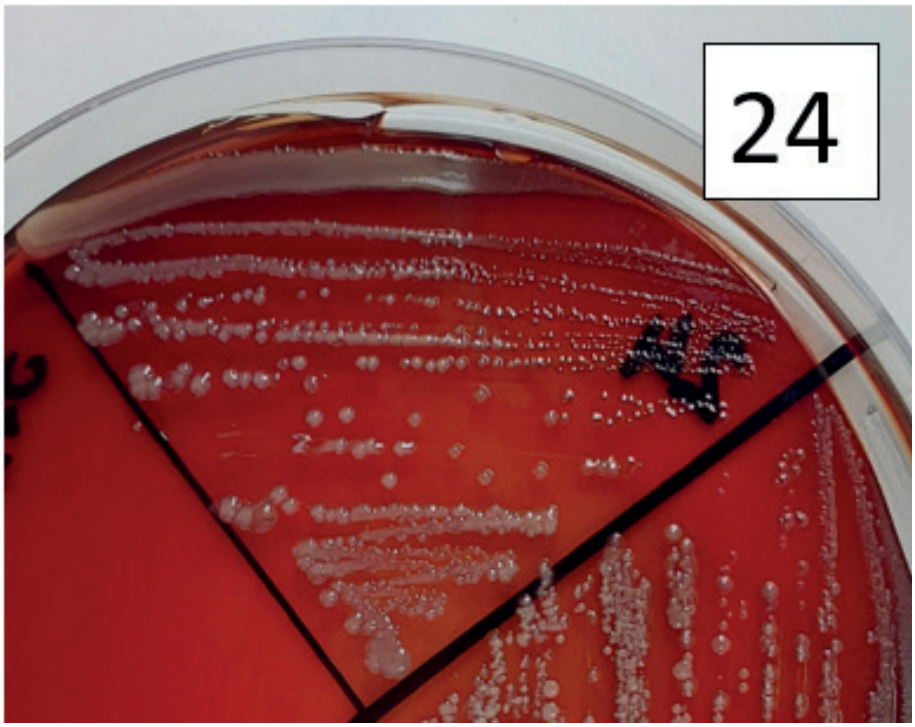
A caracterização da microbiota comensal das vias nasais de bubalinos é fundamental para compreender os mecanismos de equilíbrio microbiológico do trato respiratório superior e contribuir para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas mais específicas e eficazes. Esse conhecimento possui grande relevância econômica e sanitária, pois auxilia na redução de tratamentos inadequados e no uso indiscriminado de antibacterianos, fatores relacionados ao aumento da resistência microbiana.

Entre os microrganismos oportunistas destaca-se a *Klebsiella* sp., bactéria Gram-negativa de ampla distribuição ambiental, encontrada em solo, água, plantas e também como integrante da microbiota do trato gastrointestinal e respiratório superior de mamíferos. Sua elevada capacidade de sobrevivência em diferentes ambientes está associada à presença de uma cápsula polissacarídica protetora. Por ser um agente oportunista, especialmente no caso de *Klebsiella pneumoniae*, essa bactéria pode desencadear processos infecciosos em animais imunossuprimidos, causando prejuízos econômicos aos rebanhos(Bernardes, 2007; Bosh *et al*, 2013).

Estudos anteriores demonstram a importância desse microrganismo em enfermidades respiratórias de bubalinos. Choudhary *et al*. (2019) isolaram *K. pneumoniae* em 90 de 98 amostras pulmonares de búfalos com pneumonia. Em contrapartida, pesquisas realizadas por El-Latif (2011) e Hashem *et al*. (2022) não identificaram *Klebsiella* sp., evidenciando que a composição da microbiota respiratória pode variar conforme a região e as condições dos animais. Nesses estudos, outros agentes bacterianos, como *Pasteurella multocida* e *Staphylococcus aureus*, foram associados às infecções respiratórias.

Na presente pesquisa, todos os bezerros bubalinos avaliados apresentaram-se clinicamente saudáveis, com parâmetros fisiológicos normais, bom escore corporal e ausência de sinais respiratórios. Foram isoladas 89 colônias bacterianas, das quais 12 foram classificadas como bacilos Gram-negativos. A partir da análise bioquímica e da comparação com a literatura, três colônias (24, 25 e 32T) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Klebsiella* sp. Os testes bioquímicos apresentaram resultados compatíveis com *Klebsiella pneumoniae*, incluindo positividade para Citrato de Simmons e lisina e negatividade para motilidade.

Figura 7 – Colônia identificada como *Klebsiella* sp. cultivada em ágar sangue.



Fonte: Autor, 2025.

Tabela 1 – Resultado dos testes bioquímicos para as bactérias identificadas como Gram-positiva.

Isolados	Catalase	Oxidase	SIM	Indol	TSI	Urease	LIA	Citrato	VM	VP	Manose	Maltose
3	-	+	-	-	Ápice rosa	-	+	+	-	-	-	-
6	-	+	-	-	Ápice rosa	-	+	+	-	-	-	-
24	+	-	-	-	+ (com gás)	-	+	+	-	+	+	+-
25	+	-	+	+	+ (com gás)	-	+	+	-	+	+	+
31T	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
32A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
32 T	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
35B	+	-	-	-	+ (lactose e sacarose)	-	x	x	x	-	+	+
37B	-	-	+	+	+ (sacarose e glicose)	-	-	-	+	+	+	+
27	+	-	-	-	Ápice rosa	-	+	+	+	-	-	-
45MNp	-	-	-	-	+ (glicose, sacarose e lactose)	-	-	-	+	+	+	+
87	+	-	-	-	+ (glicose e sacarose)	-	x	-	+	-	+	-

Legenda: SIM – motilidade; TSI – triplo sugar iron; LIA – lisina; VM – vermelho de metila; VP – Voges Proskauer.

Fonte: Autor, 2025.

Na análise por espectrometria de massa MALDI-TOF, apenas o isolado 24 foi confirmado como Klebsiella pneumoniae, enquanto os isolados 25 e 32T permaneceram identificados apenas como Klebsiella sp. Esses achados corroboram estudos anteriores que demonstram a presença desse gênero bacteriano em bezerros bubalinos saudáveis, reforçando seu papel como integrante da microbiota comensal e seu potencial oportunista em situações de desequilíbrio imunológico.

CONCLUSÃO

A bubalinocultura na Baixada Maranhense representa uma importante atividade econômica e social, especialmente para pequenos produtores e agricultores familiares, devido à elevada capacidade adaptativa dos bubalinos às condições edafoclimáticas da região. Apesar da rusticidade desses animais, as enfermidades respiratórias continuam sendo um desafio sanitário relevante, principalmente em bezerros, que apresentam maior susceptibilidade em decorrência da imaturidade do sistema imunológico e das condições ambientais favoráveis à disseminação de agentes infecciosos.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a microbiota respiratória de bezerros bubalinos saudáveis é composta por diferentes microrganismos. A identificação de isolados compatíveis com *Klebsiella pneumoniae* por meio de testes bioquímicos e confirmação por espectrometria de massa, MALDI-TOF, reforça o papel desse agente como integrante da microbiota comensal do trato respiratório superior, podendo atuar como patógeno oportunista em situações de imunossupressão ou desequilíbrio microbiológico.

Além disso, os achados evidenciam a importância da caracterização microbiológica regional, uma vez que a composição da microbiota pode variar conforme as condições ambientais, sanitárias e de manejo dos rebanhos. O isolamento de *Klebsiella* sp. em animais clinicamente saudáveis demonstra que a simples presença do microrganismo não está necessariamente associada à ocorrência de enfermidades, mas ressalta a necessidade de monitoramento constante, considerando seu potencial patogênico.

Dessa forma, o presente estudo contribui para o conhecimento da microbiota respiratória de bezerros bubalinos na Baixada Maranhense, fornecendo informações relevantes para futuras pesquisas e para o desenvolvimento de estratégias sanitárias mais eficazes. O entendimento da dinâmica desses microrganismos pode auxiliar na adoção de medidas preventivas, no uso mais racional de antimicrobianos e na redução de perdas econômicas associadas às doenças respiratórias, favorecendo a sustentabilidade e o fortalecimento da cadeia produtiva bubalina na região.

REFERÊNCIAS

BERNARDES, O. **Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica.** Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 31, n. 3, p. 293 – 298, 2007.

BOSCH, AATM, G.; BIESBROEK, K.; TRZCINSKI, EAM Sanders; BOGAERT, D. **Interações virais e bacterianas no trato respiratório superior**. 2013 PLoS Pathog. 9.https://doi.org/10.1371/ journal.ppat.1003057.

DAMÉ, Maria. **Sanidade de bubalinos no extremo sul do Brasil**. 2019. p. 30. Documentos/ Embrapa Clima Temperado., Pelotas, RS, Brasil.

EL-LATIF, M.M. ABD. **Some bacteriological studies on respiratory affections in calves among buffalo farm in Dakahlia governorate**. Assiut Vet. Med. Journal. 2011. v. 57, n. 129. Mansoura Laboratory.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. p. 257 – 269, ed. 4. Editora Guanabara Koogan LTDA. Rio de Janeiro, Brasil. 2022.

HASHEM, Youserya M.; MOUSA, Walid S.; ABDEEN, Eman E.; ABDELKHALEK, Hanaa M.; NOORUZZAMAN, Ahmed; SOLIMAN, Enas A.; WARETH, Gamal. **Prevalence and molecular characterization of** *Mycoplasma* **species,** *Pasteurella multocida*, **and** *Staphylococcus aureus* **isolated from calves with respiratory manifestations**. Animals. 2022. v. 12, n. 312. DOI: https://doi.org/10.3390/ani12030312. Menoufiya Governorate, Egito.

MAHMOUD, M. A.; MAHMOUD, Nahed A.; ALLAM, A. M. **Investigations on infectious bovine rhinotracheitis in egyptian cattle and buffaloes**. Global Veterinaria. 2009. v. 3, n. 4, p. 335-340. Giza, Egypt.

NETO, Osman José. et al. **Aspectos da cadeia produtiva de búfalos no Brasil**: uma revisão. Revista Científica Multidisciplinar. 2023. v. 4. Zootecnia, Revista Científica Multidisciplinar, Brasil.

NUNES, Athos Aramis Tópor. **Resistência a antimicrobianos e fatores de virulência em** *Klebsiella* **sp. isoladas da Laguna de Tramandaí**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande so Sul, Instituto de Ciência Básica da Saúde. 114f. 2017.

PESTANA, Misael; CARRASCAL-TRIANA, Erly; RAMOS, Matiluz; ORTEGA, Diego. **Seroprevalence and associated factors of viral agentes of the bovine respiratory disease complex in buffaloes of Colombia**. 2022. v.25:8. Microbiologia, Ciência Rural, Santa Maria, Colômbia.

QUINN, P. J.et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. ARTMED Editora S.A. Rio Grande do Sul. 2007.

SCHAFFER, Aaron P.; LARSON, Robert L.; CERNICCHIARO, Natalia; HANZLICEK, Gregg A.; BARTLE, Steven J.; THOMSON, Daniel U. **The association between calhood bovine respiratory disease complex and subsequent departure from the herd milk production, and reproduntion in dairy cattle**. JAVMA. 2016. v. 248, n. 10. Manhattan, Estados Unidos da América.

SEKER, Esra; YARDIMCI, Hakan. **The aerobic bacterial flora of the nasal cavity in healthy Anatolian water buffalo calves**. 2010. p. 65-67. Medicina Veterinária, Ankara University, Turquia.

VIEIRA, J. N., et al. **Bubalinocultura no Brasil**: *Short communication*. PUBVET. 2011. v. 5. Londrina, Brasil.