

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu, SP

Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas

THAÍS SPESSOTTO BELLO

Botucatu-SP

Abril, 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Campus de Botucatu, SP

Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas

THAÍS SPESSOTTO BELLO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Medicina Veterinária como requisito para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Coorientadores: Prof. Dr. Geraldo de Nardi Júnior

Profa. Dra. Lorrayne de Souza Martins

Prof. Dr. Rodrigo Garcia Motta

BOTUCATU-SP

Abril, 2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Bello, Thaís Spessotto.

Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas / Thaís Spessotto Bello. - Botucatu, 2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Coorientador: Geraldo de Nardi Júnior

Coorientador: Lorrayne de Souza Martins

Coorientador: Rodrigo Garcia Motta

Capes: 50502000

1. Cordeiros. 2. Etiologia. 3. Espectrometria de Massas.
4. Cordão umbilical. 5. Farmacorresistência bacteriana. 6. Infecções neonatais - Medicina veterinária.

Palavras-chave: Cordeiros; Etiologia; MALDI-TOF MS; Onfalopatias infecciosas; Resistência bacteriana.

Impacto potencial desta pesquisa

Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas

Impacto científico esperado: Identificação molecular dos patógenos encontrados em infecções umbilicais em cordeiros, resistência múltipla bacteriana e avaliar a microbiota umbilical de cordeiros saudáveis.

Impacto social: A identificação dos micro-organismos isolados possibilitará o uso racional de antimicrobianos e a adoção de ações específicas de controle/profilaxia da doença.

Impacto econômico: A identificação dos principais patógenos permite ao produtor traçar estratégias de profilaxia e controle mais direcionadas, diminuindo as perdas econômicas com mortalidade e custos veterinários.

Potential impact of this research

Etiology and antimicrobial resistance in isolates from lamb's umbilical infection diagnosed by mass spectrometry

Scientific impact: Molecular identification of pathogens found in umbilical infections in lambs, multidrug-resistant bacteria and evaluate the umbilical cord's microbiota.

Social impact: The identification of microorganisms isolated from umbilical infections enables the rational use of antibiotics and the adoption of actions of prophylaxis/control of the disease.

Economic impact: The identification of the main pathogens allows the producer to build strategies to prevent and control the umbilical infection more efficiently, reducing the economic losses with mortality and veterinary costs.

Nome da autora: Thaís Spessotto Bello

Título: Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ-UNESP, Botucatu, SP

Prof. Associado Rogério Martins Amorim

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ-UNESP, Botucatu, SP

Prof. Colaborador Rodolfo José Cavalcanti Souto

Membro

Clínica de Bovinos- UFRPE- Garanhuns/PE

UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Garanhuns, PE

Data da defesa: 19 de abril de 2024.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais, Cristiana Cagnoni Spessotto Bello e Cícero Rubens Ribeiro Nogueira Bello, por serem meu alicerce e confiarem em mim até nos dias em que eu não confiava mais. Vocês dois são meus exemplos de resiliência e força. Amo vocês, essa conquista é nossa.

Ao professor Márcio Garcia Ribeiro, por ter aceitado ser meu orientador de estágios há 7 anos, me acompanhando também na residência e no mestrado. Obrigada por ser um exemplo de profissional, por ter confiado em mim para realização do trabalho, pela empatia e compreensão quando passei por momentos difíceis e por todos os conselhos.

Aos meus co-orientadores, Geraldo de Nardi Júnior, Lorryne de Souza Martins Motta e Rodrigo Garcia Motta. Agradeço pela ajuda nas coletas e pelos conselhos na pós-graduação. Sem a colaboração de vocês, esse trabalho não teria sido possível.

Ao técnico do laboratório (agora ex-técnico) Fernando José Listoni, por todos os ensinamentos microbiológicos e pelos inúmeros conselhos de vida. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de aprender tanto com o senhor e espero ter o privilégio de passar seu conhecimento adiante.

Aos meus colegas do laboratório, em especial Fábio Portilho, pelos momentos compartilhados na bancada, pela ajuda com as burocracias da pós-graduação, com o SAGE-Fapesp, pelos conselhos e pelo companheirismo nos dois anos de mestrado. Quem ajuda pode não se lembrar, mas quem é ajudado, jamais esquecerá.

Aos meus amigos Wendel Carlos e Camila Mendes, pelo companheirismo, risadas e apoio durante o mestrado. Vocês tornaram a caminhada mais leve e por isso serei para sempre grata.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2021/15085-8).

Sumário

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Aspectos da ovinocultura e criação de cordeiros	4
2.2.2 Etiologia das infecções umbilicais em cordeiros	6
2.2.3 Epidemiologia.....	6
2.2.4 Sinais clínicos.....	7
2.2.5 Métodos de diagnóstico.....	8
2.2.6 Prognóstico	9
2.2.7 Ações de profilaxia e controle.....	9
2.2.8 Abordagem terapêutica e resistência bacteriana aos antimicrobianos	10
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA).....	13
4.2 Delineamento amostral.....	13
4.3 Colheita e processamento de amostras.....	14
4.4 Cultivo bacteriológico e fúngico:	14
4.5 Teste de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i> dos isolados.....	15
4.6 <i>Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry</i> (MALDI-TOF MS). 15	
4.7 Análise estatística.....	16
5. RESULTADOS	17
5.1 Dados dos cordeiros amostrados.....	17
5.2 Isolamento de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica	18
5.3 Teste de sensibilidade microbiana <i>in vitro</i>	24
5.4 Análise estatística.....	28
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES.....	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
Anexo I -	45

BELLO, T.S. **Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas.** Botucatu, SP, 2024. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

Os primeiros meses após o nascimento são considerados críticos na vida do cordeiro, em virtude da elevada ocorrência de mortalidade secundária às infecções umbilicais, comumente relacionadas ao consumo inadequado de colostro, deficiências na antisepsia umbilical pós-parto e manutenção dos animais recém-nascidos em ambientes com sujidades, fezes e umidade. Apesar dos prejuízos causados na ovinocultura, número restrito de estudos tem investigado os agentes causais de onfalopatias infecciosas em cordeiros, ficando restritos a relatos de caso e com o diagnóstico em nível de espécie dos micro-organismos usualmente baseados em testes fenotípicos convencionais. Diante deste cenário, o presente estudo investigou a etiologia microbiana das infecções umbilicais em cordeiros - diagnosticada por espectrometria de massas -, os escores de gravidade clínica das lesões umbilicais (escore 1 ou leve, escore 2 ou moderada e escore 3 ou grave) e a ocorrência de multirresistência dos isolados aos antimicrobianos. Foram coletados assepticamente suabes umbilicais de 128 cordeiros com sinais clínicos de infecções umbilicais e de 41 cordeiros hígidos. Os suabes foram submetidos ao cultivo microbiológico, teste de sensibilidade microbiana *in vitro* e identificação dos micro-organismos por espectrometria de massas. Foram identificados 214 micro-organismos (bactérias e leveduras) em amostras de infecção umbilical e 116 isolados em cordeiros sadios. Nos casos de infecções umbilicais, foi observado predomínio do grupo das enterobactérias (87/214=41%), com associação significativa ($p<0,05$) da *Escherichia coli* (24/214=11%) em cordeiros com escores 2 e 3 de gravidade clínica. Em cordeiros sadios, ampla variedade de bactérias foi isolada com número expressivo de micro-organismos gram-positivos, com predomínio de *Desemzia incerta* (14/116=12%). Nas infecções umbilicais envolvendo bactérias gram-negativas, gentamicina foi o antimicrobiano mais efetivo (106/131=81%), enquanto os isolados foram resistentes principalmente a ampicilina (66/87=75%). Para as bactérias gram-positivas, a amoxicilina com ácido clavulânico apresentou boa eficácia (20/26=77%). A multirresistência bacteriana foi observada em 20% (36/182) dos isolados obtidos de infecção umbilical. Dentre 60 animais com sinais clínicos compatíveis com complicações das infecções umbilicais (pneumonia, artrite, sepse), 58% (35/60) evoluíram para óbito. Grande variedade de espécies de bactérias foram identificadas nos animais amostrados, em cultura pura e/ou em associação, ressaltando a complexidade etiológica das infecções umbilicais em cordeiros, com predomínio de

enterobactérias, e a necessidade de adoção de ações de profilaxia/controla da doença nos criatórios.

Palavras-chave: onfalopatias infecciosas, cordeiros, etiologia, resistência bacteriana, MALDI-TOF MS

BELLO, T.S. **Etiology and antimicrobial resistance in isolates from lamb's umbilical infection diagnosed by mass spectrometry**. Botucatu, SP, 2023. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

The first months after birth are considered critical in the life of the sucking lamb, due to the high occurrence of mortality secondary to umbilical infections, commonly related to inadequate consumption of colostrum, deficiencies in postpartum umbilical antisepsis, and maintenance of newborn animals in environments with dirt, feces, and moisture. Despite the losses in sheep farming, a lack of studies has focused on the causal agents of umbilical infections in lambs, and descriptions have been restricted to the report of cases and diagnosis at the species level of the pathogens based on conventional phenotypic tests. Considering this scenario, the present study investigated the bacterial and fungi etiology of umbilical infections in suckling lambs diagnosed by mass spectrometry, the clinical scores of umbilical severity of infections (score 1 or mild, score 2 or moderate and score 3 or severe), and multidrug resistance of isolates. Were aseptically collected 128 and 41 umbilical samples from diseased and apparently healthy lambs, respectively. All samples were subjected to microbiological culture, antimicrobial susceptibility pattern, and identification of agents based on mass spectrometry. Two hundred and fourteen bacteria and yeast species were identified among diseased lambs and 116 bacterial species from apparently healthy animals. Enterobacteria group (87/214=41%), particularly *Escherichia coli* (24/214=11%) showed significant association ($p<0,05$) in lambs with scores 2 and 3 at clinical severity. Among healthy umbilical samples, a set of bacteria was identified, particularly *Desemzia incerta* (14/116=12%). In animals with umbilical infection, gentamicin was the most effective antimicrobial (106/131=81%) in gram-negative bacteria, whereas the isolates revealed resistance mainly against ampicillin wasn't effective (66/87=75%). Among the gram-positive micro-organisms, amoxicillin/ clavulanic acid was effective (20/26=77%). Multidrug resistance was observed among 20% (36/182) of lambs with umbilical infections. Among 60 animals showing clinical signs compatible with complications secondary to umbilical infections (pneumonia, arthritis, sepsis) 58% (35/60) died. A variety of bacteria were identified among animals sampled, either in pure culture or in coinfections/cooccurrence, highlighting the nature

66 of umbilical infections in lambs, with a predominance of Enterobacteria group, and the need to
67 adopt measures to control/prevent the disease in farms.

68

69 ***Keywords:** infectious omphalopathies, lambs, etiology, bacterial resistance, MALDI-TOF
70 MS

1. INTRODUÇÃO

A produção de produtos e subprodutos de origem ovina tem aumentado em todo o mundo, incluindo carne, leite e produção de lã, particularmente por consumidores adeptos ao sabor da carne ovina ou intolerantes ao leite bovino. Estima-se que o Brasil detenha cerca de 21,5 milhões de ovinos, concentrados principalmente nas regiões nordeste e sul do país (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2022).

Os processos infecciosos estão entre as principais causas de morbimortalidade nos primeiros três meses de vida dos ruminantes (HOLMØY et al., 2012; NÓBREGA JR. et al., 2014; TORA et al., 2021; MEE, 2023). Em bezerros, a taxa de morbidade por enfermidades infecciosas neste período pode atingir 73% dos animais. Entre as principais infecções em cordeiros merece destaque as onfalopatias infecciosas, que podem evoluir para complicações pulmonares, articulares, abscessos em órgãos e septicemias, com elevada mortalidade. Estima-se entre 6% e 31,3% a mortalidade de cordeiros relacionadas às infecções umbilicais (HOLMØY et al., 2012).

A inadequada transferência de imunidade passiva pelo colostro é considerado o principal fator de risco de mortalidade em cordeiros por causas infecciosas (incluindo umbilicais) (BINNS et al., 2002; BARRY et al., 2022), aliada às deficiências na antisepsia umbilical no pós-parto imediato, nascimento de animais fracos, má nutrição, e a permanência dos animais recém-nascidos em ambientes sujos, úmidos, com excesso de matéria orgânica (fezes) e variações bruscas de temperatura (GIADINIS et al., 2011; NÓBREGA JR. et al., 2014; WIELAND et al., 2016). Hordofa et al. (2021) referiram que, nas regiões de clima tropical, a temperatura e a umidade favorecem a transmissão e a multiplicação de micro-organismos patogênicos, favorecendo infecções em ruminantes domésticos nos primeiros meses de vida.

Cordeiros acometidos por infecções nos primeiros meses de idade impactam negativamente a produção, pois se tornam animais fracos, apresentam menor peso corporal (com consequente menor remuneração pela carcaça), e requerem gastos adicionais com assistência e tratamento (ROBINSON et al., 2015).

As onfalopatias de origem infecciosa em ruminantes domésticos - incluindo cordeiros - apresentam etiologia complexa, principalmente de origem bacteriana, com predomínio de enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), estafilococos, estreptococos e certos actinomicetos (*Trueperella pyogenes*) (HOLMØY et al., 2012; RUTHERFORD et al., 2014;

NÓBREGA JR. et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015; CONSTABLE et al., 2016; MARTINS et al., 2022).

As infecções umbilicais em ruminantes domésticos ocorrem por via ascendente, a partir do contato do resquício do cordão umbilical com sujidades, matéria orgânica, solo, fezes e utensílios de uso comum (WINDEYER et al., 2014; CONSTABLE et al., 2016; GOMES, 2021). Os patógenos se estabelecem primariamente na região umbilical dos cordeiros e, comumente, se disseminam para outros órgãos, causando pneumonia, (poli)artrite, abscessos em órgãos, encefalites e/ou sepse, com prognóstico reservado e alta mortalidade neonatal (NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014; SATO et al., 2021; SMISTAD et al., 2021).

Edema, dor à palpação e hiperemia do umbigo, com ou sem secreção purulenta aparente, representam os sinais clínicos mais comuns das onfalopatias de origem infecciosa em ruminantes domésticos (RUTHERFORD et al., 2014; STEERFORTH e VAN WINDEN, 2018), embora, frequentemente, os animais evoluam para sinais sistêmicos decorrentes da disseminação dos patógenos (HOLMØY et al., 2012; NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014). Em bezerros bovinos, a gravidade das lesões umbilicais é classificada em escores: 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (grave) (RODRIGUES et al., 2010; STEERFORTH e VAN WINDEN, 2018).

O diagnóstico de rotina das infecções umbilicais em cordeiros é baseado nos achados clínico-epidemiológicos, incluindo o exame físico do umbigo e parâmetros fisiológicos dos animais, além do cultivo microbiológico dos agentes (UNDERWOOD et al., 2015; STEERFORTH; VAN WINDEN, 2018). No entanto, o diagnóstico em nível de espécies dos agentes etiológicos identificados em infecções umbilicais em cordeiros tem sido fundamentado usualmente em testes fenotípicos convencionais (RUTHERFORD et al., 2014; NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015).

O tratamento das infecções umbilicais em cordeiros tem sido baseado em antimicrobianos de amplo espectro, com apresentação por via sistêmica, em virtude dos riscos de disseminação linfo-hematógena dos patógenos (SCOTT et al., 2011; HOLMØY et al., 2012; NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014; UNDERWOOD et al., 2015).

Apesar do impacto econômico decorrente das complicações clínicas e mortalidade de cordeiros secundárias às infecções umbilicais, estudos compreensivos sobre onfalopatias infecciosas em cordeiros estão praticamente restritos a espécie bovina (STEERFORTH e WINDEN, 2018; TORA et al., 2021; MARTINS et al., 2022) e a descrição de relatos de casos em ovinos com diagnóstico dos agentes baseados em testes fenotípicos convencionais (BINNS et al., 2002; REIS et al., 2009; NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014; UNDERWOOD et al., 2015).

137 Ainda, na literatura consultada, não foram encontrados estudos que avaliassem a gravidade
138 clínica das infecções umbilicais em cordeiros, tampouco a associação dos escores de gravidade
139 das onfalopatias com os agentes etiológicos. Neste cenário, o presente estudo investigou a
140 etiologia microbiana das infecções umbilicais em cordeiros diagnosticada por espectrometria
141 de massas (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* –
142 MALDI TOF MS), os escores de gravidade clínica das lesões umbilicais e a ocorrência de
143 multirresistência *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento
144 da afecção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos da ovinocultura e criação de cordeiros

A criação de ovinos tem se expandido em muitos países decorrente de consumidores adeptos ao sabor da carne ovina, intolerantes ao leite bovino, ou para a fabricação de tecidos a base de lã. No Brasil, estima-se população de 21,5 milhões de ovinos, criados principalmente nas regiões nordeste e sul do país, com o estado da Bahia representando o maior produtor (IBGE, 2022).

A ovinocultura representa uma alternativa viável para a produção de alimentos (carne e leite) e de lã, especialmente para pequenos criadores, em regime extensivo ou semiextensivo. Além da criação das raças tradicionais (Santa Inês, Somalis, Morada Nova), o Brasil possui a criação de raças nativas (Crioula), extremamente adaptadas, incluído às condições áridas do sertão (ELOY et al., 2007). No entanto, os primeiros meses de criação dos cordeiros (assim como em outras espécies) são considerados período crítico, particularmente pelo desenvolvimento de doenças infecciosas, que impactam negativamente a produção, em virtude do menor desenvolvimento corporal e mortalidade de animais (HOLMØY et al., 2012; MEE, 2023).

2.2 Infecções umbilicais em cordeiros

As doenças neonatais em cordeiros apresentam caráter multifatorial e estão relacionadas a interação entre patógenos, deficiências higiênico-sanitárias no pós-parto imediato, deficiente ingestão de colostro e ineficácia no procedimento de antissepsia umbilical dos animais nos primeiros dias de idade. A ingestão de colostro de qualidade nas primeiras horas de vida é essencial para a nutrição e imunidade, adquirida passivamente. A inadequada ingestão de colostro pelos ruminantes recém-nascidos tem sido diretamente relacionada com a ocorrência de doenças infecciosas nas primeiras semanas de idade, incluindo infecções umbilicais e suas complicações clínicas (CONSTABLE et al., 2016). Estima-se que as infecções umbilicais - e complicações secundárias - podem representar até 30% da letalidade dos cordeiros nas primeiras semanas da vida (HOLMØY et al., 2012).

Deficiências na transferência de imunidade passiva pelo colostro, na antissepsia umbilical pós-parto, extremos de temperatura, má nutrição e permanência dos animais recém-nascidos em ambientes sujos, úmidos e com excesso de matéria orgânica (fezes) são

considerados os principais fatores de risco para o desenvolvimento de infecções umbilicais em ruminantes domésticos (BINNS et al., 2002; GIADINIS et al., 2011; NÓBREGA JR. et al., 2014; WIELAND et al., 2016).

As infecções umbilicais em cordeiros causam prejuízos econômicos significativos relacionados ao atraso no desenvolvimento dos animais, descarte precoce, mortalidade, gastos com reposição e tratamento de animais e assistência profissional (HOLMØY et al., 2012).

2.2.1 Aspectos anatomopatológicos do umbigo dos ruminantes domésticos

O cordão umbilical (umbigo) é responsável pelo elo materno-fetal durante a vida intrauterina, possuindo células-tronco (multipotentes) em sua estrutura, responsável por fornecer nutrientes necessários para o desenvolvimento do feto e pela eliminação de metabólitos. É constituído por duas artérias (projetadas na porção caudal, que se comunicam diretamente com as artérias ilíacas), uma veia (localizada na região cranial, que se comunica diretamente com o fígado e, após o nascimento, se tornará o ligamento redondo do fígado) e o úraco (diretamente conectado com a vesícula urinária) (GOMES, 2021; VAN CAMP et al., 2022).

As onfalopatias são mais comuns em cordeiros nos primeiros meses de vida e são classificadas pela localização e estruturas anatômicas, denominadas onfalites, onfaloflebites, onfaloarterites, uraquites e panvasculites. As onfalites se caracterizam como inflamações da porção externa do umbigo e, em virtude da maior exposição ao meio ambiente, é a afecção umbilical mais comum. Os animais apresentam edema e dor à palpação, podendo ocorrer abscessos e complicações secundárias a partir da disseminação de patógenos (pneumonia, poliartrite, abscessos em órgãos, encefalite e septicemia).

As onfaloflebites ocorrem secundárias a inflamação da veia umbilical, também associada às complicações descritas nas onfalites, bem como hepatite necrotizante. As onfaloarterites se caracterizam como inflamação das artérias umbilicais e são menos comuns, embora possam causar septicemia e poliartrite. A inflamação do úraco é conhecida como uraquite, podendo se manifestar por sinais de infecção do trato urinário (cistite e pielonefrite).

A panvasculite é conhecida como o processo inflamatório de vasos, artérias e demais estruturas que compõem o umbigo, com frequente agravamento por disseminação sistêmica (OLIVEIRA, 2017; GOMES, 2021; VAN CAMP et al., 2022).

2.2.2 Etiologia das infecções umbilicais em cordeiros

As onfalopatias em ruminantes domésticos se caracterizam como processos inflamatórios, infecciosos ou malformações de qualquer estrutura da região umbilical. O excesso de matéria orgânica no ambiente, deficiências da antisepsia umbilical no período pós-parto, ingestão inadequada do colostro, traumatismos, partos distócicos e malformações congênitas são fatores considerados predisponentes para a ocorrência da afecção (GOMES, 2021). No transcorrer do parto, ocorre a ruptura do cordão umbilical e os vasos umbilicais ficam expostos, podendo servir de porta de entrada para patógenos presentes no ambiente (fezes, matéria orgânica, solo) e da microbiota cutânea dos cordeiros, causando infecções umbilicais nos ruminantes recém-nascidos (ROBINSON et al., 2015).

Nas onfalopatias de origem infecciosa em cordeiros é frequente a disseminação de patógenos pelos vasos, artérias e útero, causando graves complicações como pneumonia, artrite, abscessos em órgãos, encefalite e sepse (GIADINIS et al., 2011; HOLMØY et al., 2012; CONSTABLE et al., 2016).

Escherichia coli, *Trueperella pyogenes*, estreptococos, estafilococos, *Pseudomonas* sp. e *Proteus* sp. são os micro-organismos mais comumente identificados nas infecções umbilicais em cordeiros (RUTHERFORD et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015; CONSTABLE et al., 2016). Ocasionalmente, abscessos hepáticos e hepatites necrotizantes em ovinos causadas por anaeróbios como *Fusobacterium necrophorum* têm sido descritas como complicações relacionadas às infecções umbilicais primárias (AGERHOLM et al., 2007). Entretanto, nestes estudos, o diagnóstico dos patógenos em nível de espécies tem sido majoritariamente fundamentado em técnicas microbiológicas fenotípicas convencionais (RUTHERFORD et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015) sem a confirmação por métodos moleculares.

2.2.3 Epidemiologia

As onfalopatias de origem infecciosa em cordeiros são mais comuns nos três primeiros meses de vida (UNDERWOOD et al., 2015). Usualmente, estão relacionadas ao consumo inadequado de colostro, má nutrição, extremos de temperatura e umidade, manutenção dos animais em ambientes com excesso de sujidades e matéria orgânica, e deficiente antisepsia umbilical no pós-parto imediato (GIADINIS et al., 2011; NÓBREGA JR. et al., 2014).

O colostro é produzido pela fêmea cinco semanas antes do parto, atingindo seu pico de produção entre 1 e 3 dias antes do parto. É bem conhecido como fonte essencial de minerais, vitaminas e proteínas das quais, as últimas, 95% representadas por imunoglobulinas, que serão responsáveis pela imunidade dos cordeiros nos primeiros meses de vida (GUNN et al., 2015). Deficiências na ingestão de colostro podem aumentar a susceptibilidade dos cordeiros às doenças infecciosas, a partir de micro-organismos presentes no ar, no ambiente ou habitantes da microbiota cutânea da região umbilical dos animais, com destaque para infecções respiratórias, entéricas, umbilicais e suas complicações. É essencial que o animal recém-nascido ingira o máximo de colostro possível nas primeiras seis horas de vida, posto que a absorção e a qualidade reduzem significativamente a partir de 24 horas após o parto (DOMINGUES e LANGONI, 2001).

Ratanapob et al. (2020) descreveram como fator de risco para mortalidade de cordeiros a nutrição e manejo das ovelhas, pois fêmeas debilitadas ou subnutridas dificilmente produzirão colostro de boa qualidade.

Os micro-organismos geralmente são transmitidos do ambiente ou da microbiota cutânea via ascendente para o interior do umbigo. Infecções por enterobactérias, fungos e outros micro-organismos presentes no ambiente geralmente estão associadas com a veiculação dos patógenos a partir do solo, fezes, terra e matéria orgânica presentes no ambiente. Em contraste, estafilococos, estreptococos (RUTHERFORD et al., 2014) e *Trueperella pyogenes* (RIBEIRO et al., 2015) podem ser veiculados para o umbigo a partir da própria microbiota oportunista da pele da região umbilical ou por dípteros (CONSTABLE et al., 2016).

O comportamento das fêmeas em lamber os cordeiros após o parto tem sido considerado outro fator de risco para a ocorrência de infecções umbilicais, secundário a veiculação de micro-organismos a partir da microbiota bucal ou cutânea. Fêmeas primíparas possuem o hábito de limpar com menor frequência os cordeiros se comparadas às múltiparas. Com efeito, cordeiros nascidos de ovelhas primíparas são menos expostos à contaminação por agentes presentes na microbiota bucal das ovelhas e da região cutânea próxima ao umbigo dos cordeiros (WIELAND et al., 2016).

2.2.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos das onfalopatias infecciosas são mais comuns em cordeiros entre 10 e 14 dias de idade e incluem edema, dor à palpação, hiperemia local, com ou sem secreção

purulenta (RUTHERFORD et al., 2014; STEERFORTH e VAN WINDEN, 2018; VAN CAMP et al., 2022).

Nos casos de disseminação dos patógenos do cordão umbilical, podem ser observadas complicações como pneumonia, poliartrite, abscessos em órgãos, encefalite e septicemia. Nas infecções disseminadas os animais podem apresentar - simultaneamente aos sinais umbilicais - febre, dificuldade de locomoção, taquicardia/taquipneia, secreção nasal, inapetência/anorexia, uveíte, incoordenação motora e decúbito (SANTANA et al., 2015; SMITH et al., 2015).

Em bezerros da espécie bovina, a gravidade das lesões umbilicais tem sido classificada em escores, a saber: 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (grave) (RODRIGUES et al., 2010; STEERFORTH e VAN WINDEN, 2018).

2.2.5 Métodos de diagnóstico

O diagnóstico de rotina das infecções umbilicais em cordeiros tem sido baseado nos achados epidemiológicos, exame físico do umbigo (inspeção, palpação umbilical e abdominal), nos parâmetros vitais dos animais (temperatura retal, frequências cardíaca, respiratória e movimentos ruminais) (UNDERWOOD et al., 2015; STEERFORTH; VAN WINDEN, 2018) e diagnóstico microbiológico de secreções umbilicais. Ocasionalmente, são associados exames subsidiários hematológicos e de imagem (MARTINS et al., 2022). Neste contexto, Reis et al. (2009) descreveram a palpação e a inspeção das estruturas umbilicais como métodos eficientes para o diagnóstico de onfalopatias. Wieland et al. (2016) referiram que, principalmente nas duas primeiras semanas de idade, a palpação umbilical é sensível para o diagnóstico das infecções umbilicais em ruminantes domésticos.

O uso de técnicas de imagem, como o ultrassom, tem sido recomendado como método complementar de diagnóstico, pois é possível diferenciar de forma não invasiva quais estruturas da região interna do abdômen foram acometidas e se há presença de hérnia umbilical, embora não seja indicado como método isolado de diagnóstico (SADAN, 2019). Wieland et al. (2016) afirmaram que a combinação da técnica ultrassonográfica com a avaliação e exame físico da região umbilical de cordeiros foi mais sensível para identificar as onfalopatias comparada ao uso isolado destes métodos de diagnóstico em bezerros a partir de três semanas de idade.

O cultivo bacteriano e testes de sensibilidade microbiana *in vitro* são recomendados nos casos de onfalopatias infecciosas em cordeiros (CONSTABLE et al., 2016). A identificação dos patógenos possibilita nortear ações de controle e profilaxia, identificando o habitat dos

agentes causais, enquanto o perfil de sensibilidade *in vitro* dos isolados, indica os fármacos mais recomendados para o tratamento.

O cultivo bacteriano tem sido realizado utilizando meios convencionais como ágar sangue e MacConkey, em aerobiose, a 37°C, mantidos por 72 horas. Ocasionalmente, quando se suspeita do envolvimento de clostrídios e outros micro-organismos anaeróbios, é possível realizar o cultivo em anaerobiose, a 37°C, mantidos por até 5 dias (QUINN et al., 2011). A identificação de agentes de origem fúngica pode ser realizada cultivando a secreção umbilical em ágar Sabouraud-dextrose, incubada em condições de aerobiose a 37°C, por até 25 dias (LACAZ et al., 1998; QUINN et al., 2011). Nos casos de septicemia, recomenda-se a hemocultura utilizando sangue total colhido com anticoagulante (SMITH et al., 2015).

A identificação dos micro-organismos nos estudos de etiologia microbiana das infecções umbilicais em cordeiros tem sido realizada predominantemente utilizando métodos fenotípicos convencionais (RUTHERFORD et al., 2014; NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014; RIBEIRO et al., 2015). Em contraste, são restritos ou quase incipientes o diagnóstico dos patógenos em nível de espécie nas infecções umbilicais em cordeiros.

2.2.6 Prognóstico

O prognóstico das onfalopatias de origem infecciosa em cordeiros é influenciado pelas estruturas acometidas (veias, artérias e/ou úraco), da idade do cordeiro, status nutricional e de imunidade, além da velocidade de evolução da afecção, dos patógenos envolvidos e da ocorrência de disseminação sistêmica. Cordeiros acima de 3 meses de idade, com progressão lenta da infecção tendem a apresentar melhor prognóstico (SANTOS, 2021). Em contraste, quando várias estruturas umbilicais estão atingidas, ou nos casos de septicemia e envolvimento de outros órgãos (pulmões, fígado, encéfalo, articulações), o prognóstico é desfavorável (SATO et al., 2021).

2.2.7 Ações de profilaxia e controle

Para evitar as infecções umbilicais em cordeiros recomenda-se que a antissepsia do umbigo seja realizada até 30 minutos pós-parto (ROBINSON et al., 2015) e repetida, a cada 24

horas, por três dias consecutivos. Após o corte do umbigo (~ 5cm de comprimento), recomenda-se imergir toda a região umbilical em solução de álcool-iodado ou iodo-povidine (5-10%) visando cauterizar o tecido e impedir a invasão ascendente de micro-organismos (DOMINGUES; LANGONI, 2001; SANTANA, 2015).

Nos EUA, tem-se investigado alternativas ao uso do iodo para a antissepsia do cordão umbilical no pós-parto de ruminantes. Solução de clorexidine 2-4% (ROBINSON et al., 2015; WIELAND et al., 2016) tem apresentado boa perfusão tecidual e atuação em ambientes com excesso de matéria orgânica. Além da antissepsia do umbigo, o cordeiro deve receber colostro de boa qualidade nas primeiras horas de vida e deve ser mantido em ambiente limpo, coberto e seco (UNDERWOOD et al., 2015; GUNN et al., 2015; ROBINSON et al., 2015).

Na ocorrência de casos clínicos de infecções umbilicais em cordeiros é indicado o cultivo microbiológico e testes de sensibilidade *in vitro* dos isolados. Posto que a ocorrência de lesões umbilicais em cordeiros tem sido causada por patógenos de reconhecido potencial zoonótico, recomenda-se colher as secreções purulentas provenientes da região umbilical - visando o diagnóstico microbiológico - utilizando equipamentos de segurança individuais (GANTER, 2015; VAN DEN BROM et al., 2020).

2.2.8 Abordagem terapêutica e resistência bacteriana aos antimicrobianos

O tratamento das onfalopatias infecciosas em cordeiros tem sido preconizado com duração entre 1 e 2 semanas, utilizando preferencialmente antimicrobianos de amplo espectro, com apresentação por via intravenosa, em virtude dos riscos de disseminação dos patógenos para outros órgãos e sepse. As sulfonamidas (com associação de trimetoprim), tetraciclina, cefalosporinas (ceftiofur), fluorquinolonas (enrofloxacino, ciprofloxacino), derivados da penicilina (amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina), aminoglicosídeos (gentamicina) e anfenicóis (florfenicol) são as classes de antimicrobianos mais utilizadas no tratamento das infecções umbilicais em ovinos (SCOTT et al., 2011; UNDERWOOD et al., 2015; CONSTABLE et al., 2016).

É possível, também, realizar o tratamento suporte do cordeiro utilizando anti-inflamatórios não esteroidais (meloxicam), fluidoterapia (endovenosa ou oral, dependendo do grau de desidratação) e antipiréticos, principalmente em casos de septicemia (WIELAND et al., 2016).

A ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos isoladas de afecções em humanos e animais é considerado problema emergente, de âmbito mundial, responsável por

aproximadamente cinco milhões de mortes em 2019 (OMS, 2022; SUN et al., 2023). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno genético, que ocorre por via cromossomal (resultado de mutações espontâneas) ou pela transferência de material genético entre bactérias (transdução, transformação e conjugação, ou por elementos móveis como plasmídeos, transposons e integrons) (GIGUÈRE et al., 2010). O aumento da ocorrência de bactérias multirresistentes coincide com a utilização em larga escala de diferentes grupos de antimicrobianos, notadamente a partir da década de 1960, no tratamento de diferentes infecções clínicas em humanos e em animais, e pelo uso industrial na conservação de alimentos. Ainda, em humanos, a presença de bactérias multirresistentes é notória em ambientes hospitalares (TRABULSI e ALTHERTUM, 2015; OMS, 2022).

Aproximadamente 70% dos antimicrobianos administrados no mundo são para o uso em animais de produção (SUN et al., 2023), incluindo na profilaxia da vaca seca. Em tese, o uso não racional de antimicrobianos em animais domésticos favorece o aumento da pressão seletiva para bactérias multirresistentes (ANDRADE e GIUFFRIDA, 2008). No entanto, pouca preocupação tem sido evidenciada em investigar a multirresistência aos antimicrobianos em bactérias isoladas de infecções umbilicais em ovinos.

Considerando a mortalidade de ovinos recém-nascidos, os consequentes prejuízos aos produtores, a complexidade etiológica das infecções umbilicais em cordeiros, a escassez de estudos sobre a multirresistência dos isolados e da associação dos patógenos com o perfil de gravidade (escores) dessa enfermidade; o presente estudo investigou a etiologia microbiana de casos de infecções umbilicais em cordeiros e a microbiota umbilical de indivíduos sadios dessa espécie, com diagnóstico de patógenos por espectrometria de massas, bem como a multirresistência *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos utilizados no tratamento das onfalopatias infecciosas.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Investigar a etiologia microbiana e a ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos obtidas de infecções umbilicais em cordeiros.

3.2 Específicos

- ✓ Investigar a presença de isolados com resistência múltipla dos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções umbilicais em cordeiros;
- ✓ Associar a identificação dos patógenos com os níveis de gravidade clínica (escores) das infecções umbilicais dos animais.
- ✓ Avaliar a microbiota de cordeiros sem sinais de infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Comitê de Ética e Uso dos Animais (CEUA)

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, sob o número 0260/2022 (Anexo I).

4.2 Delineamento amostral

Foram coletados suabes de secreções umbilicais de cordeiros naturalmente infectados com sinais de onfalopatia e de cordeiros recém-nascidos sem sinais de infecção umbilical, provenientes de animais dos estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, entre os meses de agosto de 2022 a janeiro de 2024.

Como fatores de inclusão dos cordeiros e propriedades rurais utilizadas no estudo, foram adotados os seguintes critérios: 1) presença de piquetes maternidades, 2) não realização de terapia antimicrobiana sete dias anterior a colheita das amostras umbilicais, 3) idade máxima de 60 dias para os animais com infecções umbilicais, 4) idade máxima de um dia para o grupo de animais sem sinais aparentes de infecção umbilical, uma vez que, após esse período, o cordão umbilical resaca e dificulta a realização da coleta.

Alguns produtores realizavam apenas a criação de ovinos, mas, na maioria das propriedades amostradas, a ovinocultura não era a única atividade realizada, pois havia criação simultânea de bovinos, equinos, suínos e galinhas.

Os animais utilizados no presente estudo permaneceram alojados segundo o sistema de criação de cada propriedade, não havendo interferência na rotina e manejo, constituídos em sua maioria, de sistemas de produção extensivos e sem manejo de cura umbilical.

Os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais dos cordeiros foram adaptados do proposto por Rodrigues *et al.* (2010) e Steerforth e Winden (2018), para bezerras, conforme segue:

Grau 0 (normal): estruturas umbilicais em processo de involução, sem dor, aumento de volume ou outros sinais de infecção ou inflamação. Cordeiro aparentemente sadio;

Grau 1 (infecção umbilical leve): dor à palpação, aumento de temperatura local, endurecimento e/ou aumento do diâmetro do coto umbilical (espessura maior que um lápis ou 6mm). Cordeiro sem outros sinais clínicos;

Grau 2 (infecção umbilical moderada): presença de pus e aumento da espessura

umbilical (> 6mm);

Grau 3 (infecção umbilical grave): sinais de grau 2 supracitados aliados ao aumento da temperatura retal (40°C), sinais sistêmicos (febre, letargia, apatia, taquicardia, taquipneia, inapetência ou anorexia) ou presença de hérnia.

Foram obtidos também dados de prováveis complicações dos casos de infecção umbilical (*i.e.*, artrite, pneumonia, sepse) e desfecho (morte ou cura), até seis meses após a colheita do material umbilical.

4.3 Colheita e processamento de amostras

Com o cordeiro posicionado em decúbito lateral, e após prévia antissepsia da pele e região periférica do umbigo com gaze embebida com solução de álcool (70%) e iodo (2%), foram colhidas amostras de secreção umbilical utilizando suabe esterilizado. Os suabes foram introduzidos completamente nos umbigos dos animais e, em seguida, armazenado em meio de transporte Stuart, mantidos em condições de refrigeração (4°C a 8°C) em caixa isotérmica e elemento gelado. Todas as amostras umbilicais foram colhidas por médicos veterinários treinados, incluindo na identificação dos escores de gravidade clínica e processadas no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da FMVZ- UNESP/Botucatu-SP.

4.4 Cultivo bacteriológico e fúngico:

As amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey em condições de aerobiose, a 37°C, mantidas por 72 horas. Simultaneamente, as amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e caldo cérebro coração (BHI), incubadas em condições de anaerobiose, a 37°C e mantidas por 96 horas. Os micro-organismos foram preliminarmente identificados em nível de gênero segundo aspecto das colônias e morfotintoriais dos micro-organismos (coloração de Gram) (QUINN et al., 2011), reisolados e mantidos em condição de refrigeração até o envio para diagnóstico por espectrometria de massas.

Além do cultivo bacteriológico, os suabes de todos os animais foram semeados em tubos de vidro com tampa de cortiça contendo ágar Sabouraud-dextrose, suplementado com 0,5% de cloranfenicol. Os tubos foram incubados a 37°C e examinados a cada 3 dias, por até 25 dias. Colônias com aspecto fúngico ou leveduriforme foram classificadas em nível de gênero segundo características macromorfológicas (aparência das colônias) e micromorfológicas (observação em microscopia óptica dos micro-organismos a partir de

lâminas de microcultivos em ágar batata-dextrose). A classificação das espécies foi baseada em chaves taxonômicas para fungos ambientais contaminantes e de interesse médico (LACAZ, 1998; PETRINI; PETRINI, 2013). Testes fenotípicos adicionais - baseados na utilização de diferentes substratos, fermentação ou assimilação de açúcares - foram adotados para a classificação fúngica (LIU, 2011).

Foram considerados com infecção umbilical, animais com ≥ 5 unidades formadoras de colônias (UFC) (MARTINS et al., 2022).

4.5 Teste de sensibilidade microbiana *in vitro* dos isolados

Todos os isolados de origem bacteriana foram submetidos ao teste padrão de difusão com discos conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2020a,b) utilizando nove antimicrobianos de sete classes, utilizados no tratamento de afecções bacterianas em cordeiros, a saber: 1) aminoglicosídeos (gentamicina 10 µg), 2) anfenicóis (florfenicol 30 µg), 3) cefalosporinas (ceftiofur 30 µg), 4) fluorquinolonas (enrofloxacino 5 µg e marbofloxacino 5 µg), 5) penicilinas semissintéticas e naturais (ampicilina 10 µg, amoxicilina / ácido clavulânico 10 µg), 6) tetraciclina (oxitetraciclina 30 µg) e 7) sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim 25µg).

4.6 *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS)

Todos os isolados de origem bacteriana e leveduras foram submetidos à técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF) no laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP/Pirassununga, SP. Para tanto, após o primeiro isolamento, as colônias eram diferenciadas fenotípicamente, reisoladas e mantidas em condições de refrigeração até o recultivo, com objetivo de envio de cultivos recentes (24-48h), com grande massa bacteriana, para a realização da espectrometria de massas. Entre 3 e 4 colônias recém isoladas (24-48h) em ágar sangue e/ou MacConkey foram submetidas à extração com 20-40 µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros bacterianos. Após ~15 minutos, foi adicionado - em cada amostra - 20-40 µL de acetomil (100% P.A.) na mesma proporção de ácido fórmico (1:1) e as amostras centrifugadas. Em seguida, foi adicionado 1µL de solução matriz (ácido 2-ciano- 4-hidroxicinâmico com diluição a 50% de acetomil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas

foram então dipostas no recipiente do aparelho MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2000-20.000m/z, utilizando o software FlexControl 3.3. O diagnóstico em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerado para espectros $\geq 1,7$ e $\geq 2,0$, respectivamente (GONÇALVES et al., 2014). Todos os isolados com resultado “não identificado” foram submetidos a um reteste.

4.7 Análise estatística

O cálculo do tamanho amostral foi realizado para estimar a prevalência associada a uma margem de erro. Estimou-se a prevalência de 4% de infecções umbilicais em cordeiros (ERDOĞAN e GÖKÇE, 2009). Utilizando o software OpenEpi (versão 3.0), com intervalo de confiança de 95,0% e erro absoluto de 5%, foi estimada a colheita de, no mínimo, 60 cordeiros com sinais de infecção umbilical para a condução do estudo. A colheita de animais sem sinais aparentes de infecção umbilical foi realizada, por conveniência, nas mesmas propriedades com animais clinicamente infectados.

A associação entre a ocorrência dos diferentes agentes e os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, comparando as medianas dos escores de gravidade clínica para cada grupo ou patógenos de especial interesse identificados com a gravidade do caso, considerando significante valores de $p < 0,05$ (DEAN et al., 2013).

Os grupos ou micro-organismos de especial interesse foram subdivididos conforme segue: enterobactérias, *E.coli*, *Pseudomonas* spp., enterococos, estafilococos, estreptococos, actinomicetos e miscelânea.

Foi realizado o pós teste de Dunn para as combinações que apresentaram associações estatísticas.

5. RESULTADOS

5.1 Dados dos cordeiros amostrados

Foram coletados suabes umbilicais de 128 cordeiros com sinais de infecção e 41 de cordeiros recém-nascidos (um dia) sem sinais de infecção umbilical. As amostras de animais infectados foram provenientes dos estados de São Paulo (44/128= 34,4%), do Paraná (74/128= 57,8%) e de Pernambuco (10/128= 7,8%). Das 41 amostras de animais sem sinais de infecção umbilical, 21 foram coletadas no estado de São Paulo (21/41=51%) e 20 no estado do Paraná (20/41= 49%).

Dos 128 cordeiros com sinais de infecção, 54% (68/126) eram fêmeas e 46% (58/126) eram machos, com idade variando entre 0 e 30 dias (média de 6,5 dias). Em seis animais não foi possível obter a informação de idade e em dois não foram informados dados de gênero. Dos cordeiros amostrados com sinais de infecção umbilical e dados de idade, 69% (84/122) possuíam entre 0 e 7 dias e 31% (38/122) entre 8 e 30 dias. Dos 41 cordeiros sem sinais de infecção, 54% (22/41) eram fêmeas e 46% (19/41) eram machos, até um dia de nascimento.

Dos 128 cordeiros com sinais de infecção, 25 (25/124=20%) pertenciam à raça Texel, 25 (25/124=20%) Santa Inês, 17 Dorper (17/124=14%) e 1 Berganês (1/124=0,8%). Ainda, 45,2% (56/124) foram informados como sem raça definida e em 4 animais não estavam disponíveis dados de raça. Entre os 41 cordeiros sem sinais de infecção umbilical, 7 (7/22=32%) pertenciam à raça Texel, 6 (6/22=27%) Santa Inês, 4 (4/22=18%) Lacaune, 3 (3/22=13%) Dorper e 2 (2/22=10%) Suffolk. Em 19 animais sem sinais aparentes de infecção umbilical não estavam disponíveis dados de raça.

Dentre os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais, 44,5% (57/128) dos animais apresentaram infecções leves (grau 1), 35% (45/128) moderadas (grau 2) e 20,5% (26/128) graves (grau 3). Além dos sinais de infecção umbilical, 16,5% (21/128) dos animais apresentaram diarreia, 15% (19/128) pneumonia, 8,5% (11/128) sinais septicêmicos (febre, taquicardia, dispneia) e/ou 7% (9/128) artrite. Dos 60 animais (60/128=47%) com sinais compatíveis com complicações dos casos de infecção umbilical, 58% (35/60) evoluíram para óbito.

5.2 Isolamento de micro-organismos de origem bacteriana e fúngica

Das 128 amostras umbilicais com sinais de infecção foram isolados 214 micro-organismos (entre bactérias e leveduras). A frequência de micro-organismos isolados em cultura pura ou coinfeções nos animais estão sumariadas nas Tabelas 1 e 2.

Os principais micro-organismos isolados e identificados por espectrometria de massas nas amostras de infecção umbilical foram enterobactérias e outras bactérias gram-negativas, a saber: *Escherichia coli* (24/214=11,21%), *Serratia marcescens* (8/214=3,74%), *Raoultella terrigena* (7/214=3,27%), *Aeromonas hydrophila* (6/214=2,80%), *Pseudomonas koreensis* (6/214=2,80%), *Enterobacter kobei* (6/214=2,80%), *Hafnia alvei* (5/214=2,34%), *Klebsiella oxytoca* (5/165=2,34%) e *Pseudomonas* sp. (5/214=2,34%). Do total de agentes isolados em cultura pura, 12,62% (27/214) não foram identificados pelo MALDI-TOF MS (Tabela 1).

Foram observadas coinfeções em 67 amostras (67/128= 52,34%) de animais com infecção umbilical, das quais foram encontradas 60 associações distintas de micro-organismos. As associações mais frequentes foram: *Enterococcus faecium* + *Escherichia coli* (4/67=6%), *Hafnia alvei* + *Klebsiella oxytoca* (2/67=3%), *Pseudomonas* sp. + *Candida krusei* (2/67=3%), *Escherichia coli* + não identificado (2/67=3%) e *Aeromonas hydrophila* + não identificado (2/67=3%) (Tabela 2).

Do total de amostras processadas, 3,9% (5/128) foram negativas para o isolamento microbiano. Nas amostras obtidas de cordeiros sadios, em apenas uma (1/41=2,4%) não foram isolados micro-organismos.

Nos cordeiros com sinais de infecção umbilical, 44% (56/128) apresentaram escore de gravidade clínica leve (grau 1), 35% (45/128) moderada (grau 2) e 21% (27/128) grave (grau 3).

Entre as enterobactérias e outras bactérias gram-negativas houve predomínio de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. Nas infecções por *E. coli*, 17% (4/24) apresentaram escore de gravidade clínica leve (grau 1), 50% (12/24) escore moderado (grau 2) e 33% (8/24) escore grave (grau 3). Nas infecções por *Pseudomonas* spp, 43,2% (19/44) foram classificadas como escore leve (grau 1); 34,1% (15/44) escore moderado (grau 2) e 22,7% (10/44) escore grave (grau 3).

Dos 41 animais sem sinais de infecção umbilical foram isolados e identificados por espectrometria de massas 116 micro-organismos. A frequência de micro-organismos isolados

em cultura pura e co-ocorrência nos animais sem sinais aparentes de infecção umbilical, estão sumariadas nas Tabelas 3 e 4. Nestes animais, os principais micro-organismos isolados foram *Desemzia incerta* (14/116=12,1%), *Pantoea* sp. (8/116=6,9%), *Pantoea agglomerans* (5/116=4,3%), *Pseudomonas koreensis* (4/116= 3,4%), *Pseudomonas stutzeri* (4/116= 3,4%), *Serratia fonticola* (4/116= 3,4%) e *Staphylococcus succinus* (4/116= 3,4%).

Não foram isoladas colônias sugestivas de *Clostridium* sp. ou outros anaeróbios estritos, tanto nas infecções umbilicais, quanto nas amostras provenientes de animais sem sinais de onfalopatias.

Foram isolados fungos filamentosos de 13 amostras de animais com sinais de infecção umbilical. Os fungos identificados foram: *Aspergillus* sp. (5/13=38,5%), *Aspergillus niger* (1/13=7,7%), *Aspergillus clavatus* (1/13=7,7%), *Mucor* sp. (1/13=7,7%) e *Geotrichum* sp. (1/13=7,7%). Quatro fungos retornaram como não identificados (4/13=30,7%).

608 TABELA 1. Frequência de micro-organismos isolados em cultura pura de infecções umbilicais
609 em 128 cordeiros, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Isolado	N	%
<i>Escherichia coli</i>	24	11,21
<i>Serratia marcescens</i>	8	3,74
<i>Enterococcus faecium</i>	7	3,27
<i>Raoultella terrigena</i>	7	3,27
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	2,80
<i>Pseudomonas koreensis</i>	6	2,80
<i>Enterobacter kobei</i>	6	2,80
<i>Hafnia alvei</i>	5	2,34
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	2,34
<i>Pseudomonas</i> sp.	5	2,34
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1,87
<i>Providencia rettgeri</i>	4	1,87
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	4	1,87
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4	1,87
<i>Candida krusei</i>	3	1,40
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	3	1,40
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas corrugata</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas mendocina</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3	1,40
<i>Rahnella aquatilis</i>	3	1,40
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	0,93
<i>Enterobacter asburiae</i>	2	0,93
<i>Massilia oculi</i>	2	0,93
<i>Pantoea</i> sp.	2	0,93
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas jessenii</i>	2	0,93
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	2	0,93
<i>Enterococcus hirae</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas putida</i>	2	0,93
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	2	0,93
Outros ²	44	24,30
Não identificados	27	12,62
Total Geral:	214	100

610 ¹MALDI-TOF (MS): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de
611 isolados; %: porcentagem.

612 ²Outros: *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas jandaei* (n=1);
613 *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter*
614 *koreensis* (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida catenulata* (n=1); *Citrobacter koseri* (n=1);
615 *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Escherichia*
616 *hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Kluyvera ascorbata* (n=1);

Kluyvera cryocescens (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1); *Salmonella* sp (n=1); *Siccibacter turicensis* (n=1); *Staphylococcus equorum* (n=1); *Staphylococcus xylosus* (n=1); *Streptococcus salivarius* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1).

TABELA 2. Frequência de micro-organismos isolados em associação de infecções umbilicais em cordeiros identificadas por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Micro-organismos Associados	N	%
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Escherichia coli</i>	4	6
<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Candida krusei</i>	2	3
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	2	3
<i>Escherichia coli</i> + não identificado	2	3
<i>Aeromonas hydrophila</i> + não identificado	2	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i> + não identificado	1	1,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Acinetobacter radioresistens</i> + não identificado	1	1,5
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Candida catenulata</i>	1	1,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Kluyvera ascorbata</i>	1	1,5
<i>Arthrobacter gandavensis</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1,5
<i>Enterobacter kobei</i> + <i>Leclercia adecarboxylata</i> + <i>Pseudomonas corrugata</i>	1	1,5
<i>Enterobacter kobei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Enterococcus casseliflavus</i> + não identificado	1	1,5
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,5
<i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas flavescens</i>	1	1,5
<i>Escherichia hermannii</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i> + <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	1	1,5
<i>Hafnia alvei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Klebsiella aerogenes</i> + <i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	1,5
<i>Massilia oculi</i> + <i>Serratia marcescens</i> + não identificado	1	1,5
<i>Massilia oculi</i> + <i>Staphylococcus sciuri</i> + <i>Candida krusei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Pantoea</i> sp. + <i>Klebsiella oxytoca</i> + <i>Serratia marcescens</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas corrugata</i> + <i>Enterobacter kobei</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas gessardii</i> + não identificado	1	1,5
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas mendocina</i> + <i>Pseudomonas jessenii</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas trivialis</i> + <i>Pseudomonas synxantha</i>	1	1,5
<i>Rahnella aquatilis</i> + <i>Pseudomonas azotoformans</i>	1	1,5
<i>Rahnella aquatilis</i> + <i>Pseudomonas rhodesiae</i> + <i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1	1,5
Outros ²	29	43
Total Geral	67	100

¹MALDI-TOF MS; Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações; %= porcentagem.

²Outros: *Rahnella aquatilis* + *Pseudomonas extremorientalis* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Hafnia alvei* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Pseudomonas koreensis* + *Escherichia coli* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Pseudomonas extremorientalis* + não identificado (n=1); *Serratia marcescens* + não identificado (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Enterococcus faecium* + *Achromobacter mucicolens* + *Wickerhamomyces anomalus* (n=1); *Streptococcus dysgalactiae* + não identificado (n=1); *Streptococcus salivarius* + *Pseudomonas putida* (n=1); *Enterococcus casseliflavus* + *Enterobacter kobei* + *Pseudomonas chlororaphis* (n=1); *Citrobacter koseri* + *Escherichia coli* (n=1); *Proteus hauseri* + *Serratia marcescens* (n=1); *Proteus mirabilis* + *Serratia marcescens* (n=1); *Escherichia coli* + *Siccibacter turicensis* (n=1); *Lelliottia amnigena* + *Pseudomonas* sp. (n=1); *Raoultella terrigena* + *Proteus vulgaris* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Enterobacter xiangfangensis* + *Pseudomonas rhodesiae* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Providencia rettgeri* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus penneri* (n=1); *Escherichia coli* + *Streptococcus dysgalactiae* (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Bordetella petrii* + *Cellulosimicrobium cellulans* (n=1); *Enterococcus hirae* + *Pseudomonas putida* + não identificado (n=1); *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Cellulosimicrobium cellulans* + não identificado (n=1); *Arthrobacter koreensis* + não identificado (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Enterobacter cloacae* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* + *Aeromonas hydrophila* (n=1); *Enterococcus gilvus* + *Exiguobacterium mexicanum* + *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Aeromonas jandaei* + não identificado (n=1); *Staphylococcus xylosus* + não identificado (n=1).

640 TABELA 3. Frequência de micro-organismos isolados em cultura pura de 41 cordeiros sem
 641 sinais clínicos de infecção umbilical, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-
 642 2023).

Isolado	N	%
<i>Desemzia incerta</i>	14	12,1
<i>Pantoea</i> sp.	8	6,9
<i>Pantoea agglomerans</i>	5	4,3
<i>Pseudomonas koreensis</i>	4	3,4
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4	3,4
<i>Serratia fonticola</i>	4	3,4
<i>Staphylococcus succinus</i>	4	3,4
<i>Escherichia coli</i>	3	2,6
<i>Nocardiosis dassonvillei</i>	3	2,6
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	3	2,6
<i>Pseudomonas flavescens</i>	3	2,6
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	1,7
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	1,7
<i>Enterobacter kobei</i>	2	1,7
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	2	1,7
<i>Proteus penneri</i>	2	1,7
<i>Providencia rettgeri</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas fulva</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	1,7
<i>Serratia marcescens</i>	2	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1,7
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	1,7
Outros ²	25	21,6
Não identificado	12	10,3
Total Geral:	116	100

643 ¹MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações;
 644 %= porcentagem.²*Aerococcus viridans* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus*
 645 *megaterium* (n=1); *Citrobacter braakii* (n=1); *Curtobacterium* sp. (n=1); *Enterococcus faecium* (n=1); *Exiguobacterium* sp.
 646 (n=1); *Kerstersia gyiorum* (n=1); *Klebsiella pneumoniae* (n=1); *Klebsiella variicola* (n=1); *Lactococcus garvieae* (n=1);
 647 *Paenibacillus provencensis* (n=1); *Pantoea ananatis* (n=1); *Planococcus glaciei* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=1); *Pseudomonas*
 648 *corrugata* (n=1); *Pseudomonas fluorescens* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=1); *Pseudomonas protegens* (n=1); *Pseudomonas*
 649 *straminea* (n=1); *Pseudomonas vancouverensis* (n=1); *Serratia liquefaciens* (n=1); *Serratia nematodiphila* (n=1); *Solibacillus*
 650 *silvestres* (n=1).

651

652 TABELA 4: Frequência de micro-organismos isolados em associação do umbigo de 41
 653 cordeiros sem sinais clínicos de infecção, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-
 654 2023).

Micro-organismos associados	N	%
<i>Exiguobacterium</i> sp + <i>Pseudomonas chlororaphis</i> + <i>Pseudomonas protegens</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	2,8
<i>Pantoea agglomerans</i> + <i>Pseudomonas koreensis</i>	1	2,8
<i>Staphylococcus aureus</i> + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i> + <i>Enterobacter kobei</i>	1	2,8
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i> + <i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Staphylococcus xylosus</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	2,8
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> + <i>Planococcus glaciei</i> + <i>Staphylococcus succinus</i>	1	2,8
<i>Pantoea agglomerans</i> + não identificado	1	2,8
<i>Serratia fonticola</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas azotoformans</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Curtobacterium</i> sp. + não identificado	1	
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Desemzia incerta</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea agglomerans</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas straminea</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea</i> sp. + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Arthrobacter koreensis</i>	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Pantoea</i> sp.	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Serratia marcescens</i> + <i>Pantoea</i> sp.	1	2,8
<i>Serratia marcescens</i> + <i>Pantoea</i> sp. + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea</i> sp. + <i>Enterobacter kobei</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Pseudomonas azotoformans</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Paenibacillus provencensis</i> + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Arthrobacter gandavensis</i> + <i>Solibacillus silvestres</i> + não identificado	1	2,8
<i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Lactococcus garvieae</i> + <i>Pseudomonas fulva</i> + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
<i>Staphylococcus xylosus</i> + <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
<i>Bacillus megaterium</i> + <i>Desemzia incerta</i> + não identificado	1	2,8
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Pseudomonas</i> sp.	1	2,8
<i>Serratia liquefaciens</i> + <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1	2,8
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Pseudomonas corrugata</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Serratia fonticola</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> + <i>Serratia fonticola</i>	1	2,8
<i>Pantoea ananatis</i> + <i>Pantoea agglomerans</i>	1	2,8
<i>Pantoea</i> sp. + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
Outros ²	6	16
Total Geral:	36	100

655 ¹MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações;
 656 %= porcentagem. ²*Proteus penneri* + *Serratia fonticola* + *Providencia rettgeri* (n=1); *Serratia nematodiphila* + *Providencia*
 657 *rettgeri* + *Pseudomonas jessenii* (n=1); *Desemzia incerta* + *Pseudomonas fluorescens* + *Aeromonas hydrophila* (n=1);
 658 *Escherichia coli* + *Klebsiella variicola* + *Pseudomonas koreensis* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus penneri* + *Klebsiella*
 659 *pneumoniae* + *Citrobacter braakii* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* + *Proteus vulgaris* (n=1).

5.3 Teste de sensibilidade microbiana *in vitro*

Os resultados do perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* para os principais grupos ou micro-organismos de especial interesse identificados em cordeiros com infecção umbilical estão sumariados na Tabela 5.

Gentamicina (129/162=79,6%) e marbofloxacino (106/138=76,8%) foram antimicrobianos mais eficientes, enquanto a ampicilina (88/138= 63,7%) foi o antimicrobiano em que os micro-organismos apresentaram maior resistência.

A gentamicina foi o fármaco mais efetivo diante das infecções por bactérias do gênero *Pseudomonas* (39/44=89%). Em contraste, as espécies de *Pseudomonas* apresentaram maior resistência para sulfametoxazole/trimetoprim (20/44=45%).

Para as enterobactérias, marbofloxacino (77/87=88%), gentamicina (67/87=77%) e sulfametoxazole/trimetoprim (66/87=76%) foram os antimicrobianos mais efetivos. Em contraste, alta resistência dos isolados foi observada para a ampicilina (66/87=75%), a amoxicilina/ácido clavulânico (43/87=49,5%) e para o florfenicol (41/87=47%).

Para o grupo dos enterococos, amoxicilina/ácido clavulânico foi o antimicrobiano mais efetivo (13/17=76%), enquanto os isolados apresentaram maior resistência para o enrofloxacino (13/17=76%).

Marbofloxacino (6/6=100%), ceftiofur (5/6=83%) e gentamicina (5/6=83%) foram os antimicrobianos mais efetivos para os estafilococos. Em contraste, os isolados foram resistentes principalmente à ampicilina (3/6=50%), apesar do pequeno número de estafilococos testados.

Os estreptococos apresentaram 100% (3/3) de sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico e ao ceftiofur, enquanto 67% (2/3) deste grupo de bactérias foram resistentes ao enrofloxacino, apesar do pequeno número de estreptococos testados (Tabela 5).

A multirresistência bacteriana foi observada em 36 (36/182=20%) dos isolados com sinais de infecção umbilical. A resistência múltipla aos antimicrobianos foi observada com maior frequência em isolados de *Escherichia coli* (10/24=41%), *Enterococcus faecium* (5/7=71%) e *Serratia marcescens* (2/8=25%). Do total de 36 isolados multidroga resistentes, 27 (27/36=75%) eram bactérias gram-negativas.

689 TABELA 5: Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, pelo método de difusão de discos, para os principais grupos de bactérias isoladas
690 de 128 cordeiros com sinais de infecção umbilical (2022-2023).

Grupos	Antimicrobianos	Enterobactérias (n=87)			<i>Pseudomonas</i> sp. (n=44)			Enterococos (n=17)			Estafilococos (n=6)			Estreptococos (n=3)			Miscelânea (n=25)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos	Gentamicina	67	12	8	39	2	3	-	-	-	5	0	1	-	-	-	18	1	6
		77%	14%	9%	89%	4%	7%	-	-	-	83%	0%	17%	-	-	-	72%	4%	24%
Anfenicóis	Florfenicol	27	19	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0	19	5	1
		31%	22%	47%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33%	67%	0%	76%	20%	4%
Fluorquinolonas	Enrofloxacino	34	44	9	24	18	2	3	1	13	1	4	1	0	1	2	10	8	7
		39%	50%	11%	54%	42%	4%	18%	6%	76%	17%	66%	17%	0%	33%	67%	40%	32%	28%
	Marbofloxacino	77	1	9	-	-	-	3	3	11	6	0	0	1	1	1	19	2	4
		88%	1%	11%	-	-	-	18%	18%	64%	100%	0%	0%	33%	34%	33%	76%	8%	16%
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ácido clavulânico	43	1	43	-	-	-	13	0	4	4	0	2	3	0	0	19	0	6
		49,5%	1%	49,5%	-	-	-	76%	0%	24%	66%	0%	34%	100%	0%	0%	76%	0%	24%
	Ampicilina	19	2	66	-	-	-	9	0	8	3	0	3	2	0	1	12	3	10
		23%	2%	75%	-	-	-	53%	0%	47%	50%	0%	50%	67%	0%	33 %	48%	12%	40%
	Ceftiofur	29	42	16	-	-	-	-	-	-	5	0	1	3	0	0	11	5	9
		33%	48%	19%	-	-	-	-	-	-	83%	0%	17%	100%	0%	0%	44%	20%	36%
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	56	3	28	-	-	-	9	1	7	4	0	2	1	2	0	18	0	7
		64%	3%	33%	-	-	-	53%	6%	41%	66%	0%	34%	33%	67%	0%	72%	0%	28%
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/trimetoprim	66	5	16	20	11	13	-	-	-	4	0	2	1	0	2	19	3	3
		76%	5%	19%	45%	25%	30%	-	-	-	66%	0%	34%	33%	0%	67%	76%	12%	12%

691 S=Sensível, I= intermediário, R= resistente.

692 Enterobactérias= *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis*
693 (n=3); *Escherichia coli* (n=24); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1);
694 *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus*
695 *vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter turicensis* (n=1). *Pseudomonas*
696 spp.= *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3); *Pseudomonas*
697 *extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas*
698 *mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae* (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha*
699 (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsogensis* (n=1). Enterococos= *Enterococcus casseliflavus* (n=2); *Enterococcus faecalis* (n=4); *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus*
700 *gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2). Estafilococos= *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosus* (n=1). Estreptococos= *S. dysgalactiae* (n=2); *S. salivarius*
701 (n=1). Miscelânea= *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas hydrophila* (n=6); *Aeromonas*
702 *jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1);
703 *Bordetella petrii* (n=1); *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1).

Os resultados de perfil de sensibilidade microbiano *in vitro* das 41 amostras colhidas de cordeiros sem sinais de infecção umbilical estão sumariados na Tabela 6.

Para *Pseudomonas* sp., gentamicina (26/26=100%) e enrofloxacino (16/26=62%) foram os fármacos mais efetivos.

Gentamicina (8/8=100%) e marbofloxacino (8/8=100%) foram os antimicrobianos mais efetivos para os estafilococos, enquanto a maior resistência dos isolados foi observada para sulfametoxazole/trimetoprim (3/8=37,5%), apesar do número reduzido de estafilococos.

Gentamicina (31/32=97%), florfenicol (30/32=94%) e marbofloxacino (30/32=94%) apresentaram boa eficácia para as enterobactérias.

No grupo miscelânea, oxitetraciclina (33/35=94%), amoxicilina/ácido clavulânico (32/35=91%), ampicilina (32/35=91%) e florfenicol (32/35=91%) foram os fármacos mais efetivos, enquanto os isolados revelaram maior resistência ao enrofloxacino (18/35=51%).

TABELA 6: Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, pelo método de difusão de discos, para os principais grupos de bactérias isoladas do cordão umbilical de cordeiros sem sinais de onfalite (2022-2023).

Grupos	Antimicrobianos	<i>Pseudomonas</i> sp. (n=26)			Estafilococos (n=8)			Enterobactérias (n=32)			Miscelânea (n=35)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos	Gentamicina	26	0	0	8	0	0	31	1	0	27	6	2
		100%	0%	0%	100%	0%	0%	97%	3%	0%	77%	17%	6%
Anfenicóis	Florfenicol	-	-	-	-	-	-	30	2	0	32	1	2
		-	-	-	-	-	-	94%	6%	0%	91%	3%	6%
Fluorquinolonas	Enrofloxacino	16	5	5	4	2	2	24	8	0	8	9	18
		62%	19%	19%	50%	25%	25%	75%	25%	0%	23%	26%	51%
	Marbofloxacino	-	-	-	8	0	0	30	2	0	20	9	6
		-	-	-	100%	0%	0%	94%	6%	0%	57%	26%	17%
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ácido clavulânico	-	-	-	8	0	0	18	4	10	32	0	3
		-	-	-	100%	0%	0%	56%	12,5%	31,5%	91%	0%	9%
	Ampicilina	-	-	-	6	2	0	15	6	11	32	0	3
		-	-	-	75%	25%	0%	47%	19%	34%	91%	0%	9%
	Ceftiofur	-	-	-	6	2	0	23	8	1	16	8	11
Tetraciclínas	Oxitetraciclina	-	-	-	6	1	1	26	0	6	33	1	1
		-	-	-	75%	12,5%	12,5%	81%	0%	19%	94%	3%	3%
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/trimetoprim	11	2	13	5	0	3	27	2	3	16	6	13
		42%	8%	50%	62,5%	0%	37,5%	85%	6%	9%	46%	17%	37%

S=Sensível, I= intermediário, R= resistente.

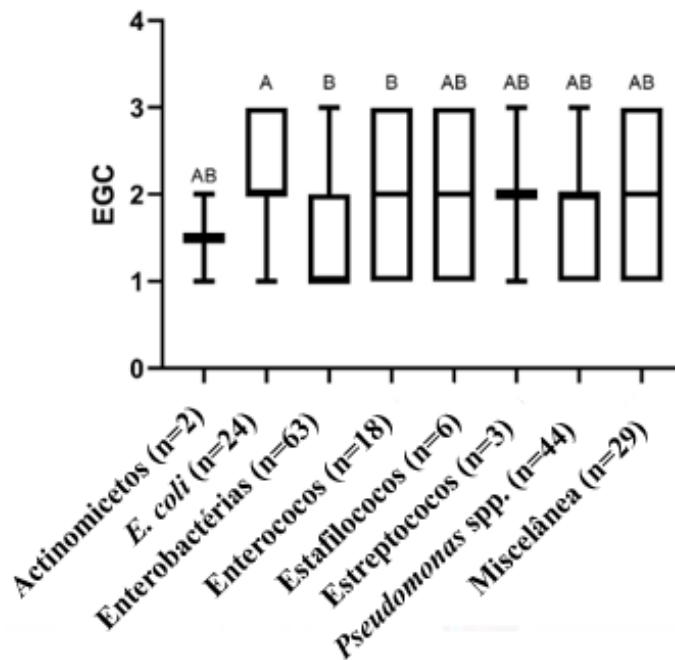
Pseudomonas spp= *Pseudomonas azotoformans* (n=2), *Pseudomonas chlororaphis* (n=3), *Pseudomonas corrugata* (n=1), *Pseudomonas flavescent* (n=3), *Pseudomonas fluorescens* (n=1), *Pseudomonas fulva* (n=2), *Pseudomonas jessenii* (n=1), *Pseudomonas koreensis* (n=4), *Pseudomonas protegens* (n=1), *Pseudomonas* sp. (n=2), *Pseudomonas straminea* (n=1), *Pseudomonas stutzeri* (n=4), *Pseudomonas vancouverensis* (n=1). Estafilococos= *Staphylococcus aureus* (n=2), *Staphylococcus succinus* (n=4), *Staphylococcus xylosus* (n=2). Enterobactérias= *Enterobacter kobei* (n=1), *Escherichia coli* (n=1), *Pantoea agglomerans* (n=1), *Serratia fonticola* (n=1). Miscelânea= *Acinetobacter lwoffii* (n=2), *Aerococcus viridans* (n=1), *Aeromonas hydrophila* (n=2), *Arthrobacter gandavensis* (n=1), *Arthrobacter koreensis* (n=1), *Bacillus megaterium* (n=1), *Curtobacterium* sp. (n=), *Desemzia incerta* (n=14), *Enterococcus faecium* (n=1), *Exiguobacterium mexicanum* (n=2), *Exiguobacterium* sp. (n=1), *Kerstersia gyiorum* (n=1), *Lactococcus garvieae* (n=1), *Nocardiopsis dassonvillei* (n=3), *Paenibacillus provencensis* (n=1), *Planococcus glaciei* (n=1), *Solibacillus silvestres* (n=1).

5.4 Análise estatística

A figura 1 confronta os principais grupos de micro-organismos identificados nos animais com infecção umbilical e os escores de gravidade clínica. Foi possível observar associação significativa ($p=0,0039$) entre as medianas dos animais com identificação de *E. coli* e escores 2 e 3 de gravidade clínica das infecções umbilicais, em comparação com as medianas dos demais grupos de micro-organismos.

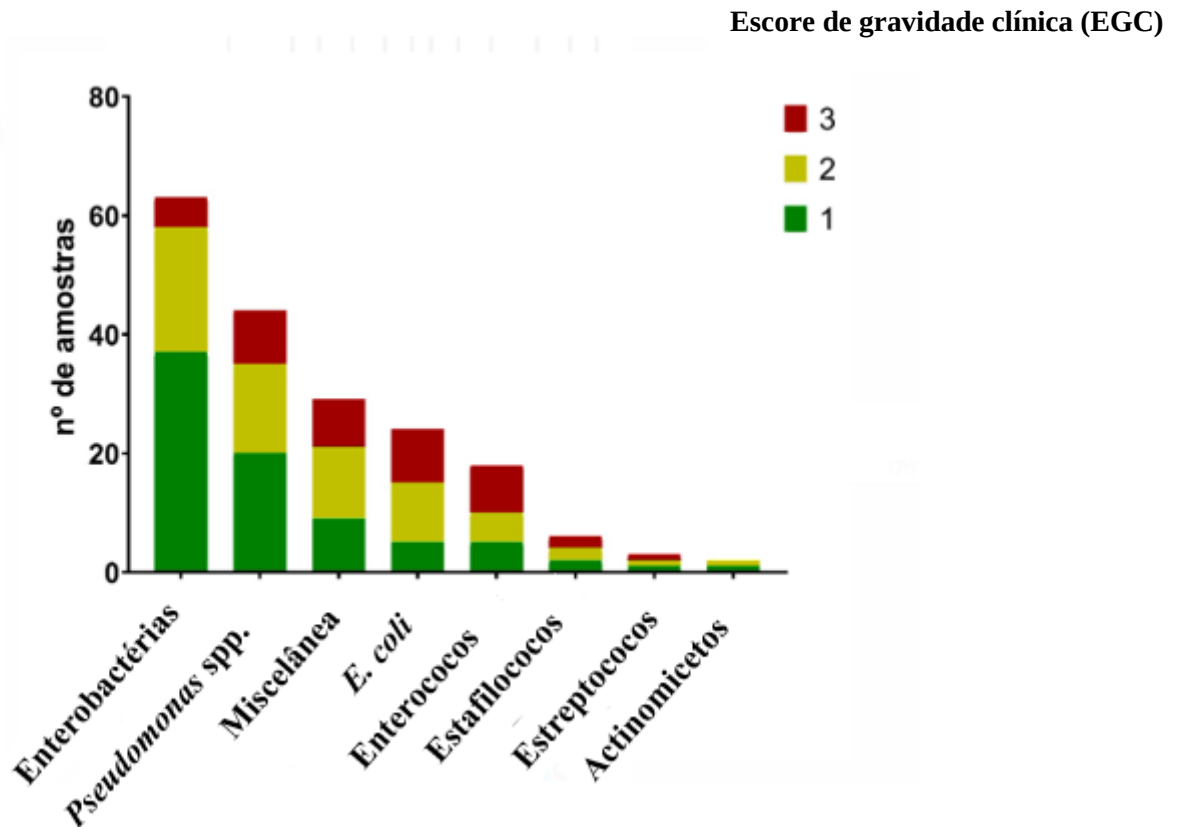
A figura 2 apresenta a frequência dos escores de gravidade clínicas das infecções umbilicais dos cordeiros, segundo os diferentes grupos/agentes identificados. Notar que *E. coli* revelou maior frequência de escores de gravidade 2 e 3, em detrimento de infecções de gravidade 1.

FIGURA 1:Boxplot dos principais grupos de micro-organismos¹ identificados por espectrometria de massas em cordeiros com infecção umbilical segundo os escores de gravidade clínica (2022-2023).



EGC: Escore de Gravidade Clínica. ¹Micro-organismos: Actinomicetos= *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2). *Escherichia coli* (n=24). Enterobactérias= *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis* (n=3); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocrescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter turicensis* (n=1). Enterococos= *Enterococcus casseliflavus* (n=3); *Enterococcus faecalis* (n=4); *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2). Estafilococos= *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosus* (n=1). Estreptococos= *S. dysgalactiae* (n=2); *S. salivarius* (n=1). *Pseudomonas* spp.= *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3); *Pseudomonas extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae* (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1). Miscelânea= *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas hydrophila* (n=6); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida krusei* (n=4); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1).

FIGURA 2: Frequência dos escores de gravidade clínica em infecções umbilicais em cordeiros, segundo diferentes grupos de micro-organismos identificados por espectrometria de massas (2022-2023).



¹Micro-organismos: Enterobactéria: *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis* (n=3); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter turicensis* (n=1). *Pseudomonas* spp.: *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3); *Pseudomonas extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas fluorescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae* (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1). Miscelânea: *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas hydrophila* (n=6); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida krusei* (n=4); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1). *Escherichia coli* (n=24). Enterococos: *Enterococcus casseliflavus* (n=3); *Enterococcus faecalis* (n=4); *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2). Estafilococos: *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosum* (n=1). Estreptococos: *S. dysgalactiae* (n=2); *S. salivarius* (n=1). Actinomiceto: *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi observada elevada complexidade de espécies bacterianas em infecções umbilicais de cordeiros com até 30 dias de idade, com avaliação dos escores clínicos de gravidade das onfalopatias, nos quais *E. coli* apresentou associação significativa com escores moderados e graves. Grande complexidade de bactérias foi encontrada também em amostras umbilicais de cordeiros com até um dia, sem sinais de infecção umbilical, com predomínio de bactérias gram-positivas.

Ainda, 20% dos isolados bacterianos obtidos de animais de infecção umbilical foram multirresistentes aos antimicrobianos, indicando a necessidade do uso racional de fármacos na abordagem terapêutica das onfalopatias em cordeiros. Dos 60 (47%) cordeiros com complicações secundárias às infecções umbilicais, 58% evoluíram para óbito, reforçando os prejuízos nos criatórios com as onfalopatias infecciosas, fato que pode ser considerado uma das principais motivações do presente estudo.

As infecções umbilicais em ruminantes domésticos apresentam etiologia multifatorial (GOMES, 2021), embora predominantemente de origem infecciosa (CARDONA *et al.*, 2011; HOLMOY *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2022), e estão relacionadas a prejuízos significativos aos produtores, principalmente secundários às complicações sistêmicas (WINDEYER *et al.*, 2014; TORA *et al.*, 2021). Ocorrem por via ascendente, pelo contato do umbigo com o solo e sujidades presentes no ambiente, ou provenientes da própria microbiota umbilical (WINDEYER *et al.*, 2014; CONSTABLE *et al.*, 2016; GOMES, 2021), e estão intimamente relacionadas à baixa imunidade do cordeiro devido à baixa ingestão ou à má qualidade do colostro ingerido, e antisepsia inadequada do cordão umbilical nos primeiros dias após o nascimento (GIADINIS *et al.*, 2011; NÓBREGA JR. *et al.*, 2014; GUNN *et al.*, 2015; RATANAPOB, *et al.*, 2020).

Grande complexidade de micro-organismos de origem bacteriana foi identificada nos 128 cordeiros com infecções umbilicais amostrados, com predomínio de enterobactérias, particularmente *E. coli*, reforçando o impacto desta espécie bacteriana na gênese dos casos, e a necessidade de adoção de ações controle nas infecções umbilicais em cordeiros, com ênfase em medidas profiláticas para agentes provenientes do próprio ambiente dos criatórios.

No presente estudo, *E. coli* foi o agente mais frequentemente isolado das infecções umbilicais dos cordeiros. Este resultado concorda com estudos similares no Brasil (NÓBREGA

JR et al., 2014; MARTINS et al., 2022) e Irã (FARADONBEH e FARADONBEH, 2016) e reafirma a relevância de *E.coli* como agente primário de onfalopatias em cordeiros.

As enterobactérias representaram os micro-organismos isolados em maior frequência nos animais amostrados com infecção umbilical, em cultura ou em associação, com destaque para as espécies dos gêneros *Escherichia*, *Serratia*, *Raoultella*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, além de outros gram-negativos como espécies de *Pseudomonas*. O predomínio de enterobactérias e outros patógenos gram-negativos nas infecções umbilicais nos cordeiros amostrados concorda com estudos similares conduzidos com cordeiros na Noruega (HOLMOY et al., 2012) e Brasil (NÓBREGA JÚNIOR et al., 2014), bem como em bezerros na Colômbia (CARDONA et al., 2011), Iran (FARADONBEH e FARADONBEH, 2016) e Brasil (MARTINS et al., 2022). Tal achado pode ser creditado a elevada exposição do umbigo, nos primeiros dias pós-parto, a patógenos que possuem como habitat o solo, fezes, matéria orgânica e água, particularmente as enterobactérias (QUINN et al., 2011; STEERFORTH e WINDEM, 2018).

E. coli pertence ao complexo grupo das enterobactérias, caracterizadas pela elevada versatilidade e adaptabilidade a diferentes biomas, alta diversidade genética, clonal e de fatores de virulência, além da resistência aos antimicrobianos convencionais (JANG et al., 2017; DENAMUR et al., 2021). *E. coli* patogênicas são classicamente subdivididas em entéricas e extraentéricas (ExPEC), e apresentam grande complexidade de fatores de virulência, incluindo produção de toxinas, fímbrias/adesinas, fatores de captação de ferro, invasinas e resistência ao soro (JANG et al., 2017; SAROWSKA et al., 2019; DENAMUR et al., 2021). No entanto, não está esclarecido o perfil genotípico de *E. coli* no estabelecimento das infecções umbilicais em ruminantes jovens, incluindo cordeiros tampouco a influência destes genes - hipoteticamente com predomínio de ExPEC - nos escores de gravidade clínica das infecções umbilicais em bezerros. Neste contexto, estudo recente no Brasil investigou genes de virulência ExPEC em *E. coli* isoladas de infecções umbilicais em bezerros comparadas a gravidade clínica dos casos, revelando predomínio de genes relacionados à resistência ao soro pelo patógeno (*traT* e *ompT*) e maior frequência de casos graves (escore 3), embora sem identificar o perfil específico de genes atribuído à afecção (MARTINS et al., 2022). Porém, não foram investigados nos cordeiros amostrados com infecção umbilical a ocorrência de genes relacionados a virulência de *E. coli*, particularmente ExPEC, fato que pode ser considerado uma limitação do presente estudo.

A padronização dos escores de gravidade clínica dos casos de infecções umbilicais de bezerras tem sido objeto de estudos nas últimas duas décadas (STEERFORTH e WINDEN, 2018). Entre os 128 animais do presente estudo, 57 (44,5%), 45 (35%) e 26 (20,5%) foram classificados com escores 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (grave) de gravidade clínica das infecções umbilicais, respectivamente. Particularmente nas infecções por *E. coli*, 83% (20/24) apresentaram escores de gravidade 2 e 3, com associação significativa ($p=0,0039$) entre as medianas dos animais com infecções por *E. coli* e as medianas observadas nos demais grupos de bactérias, sugerindo que infecções por *E. coli* sejam de alta patogenicidade, apesar da identificação de fatores de virulência da bactéria não ter sido objeto do presente estudo.

Outras enterobactérias identificadas nos animais amostrados foram representadas por espécies do gênero *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* e *Pantoea*. Tal achado reforça a complexidade etiológica e o impacto de bactérias de origem entérica, com habitat ambiental, como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros e, à semelhança dos bezerras, provavelmente são adquiridas pela elevada exposição da região umbilical à matéria orgânica, fezes, solo, terra, água ou utensílios contaminados do próprio ambiente dos animais (FARADONBEH e FARADONBEH, 2016; MARTINS et al., 2022).

Espécies de *Pseudomonas* possuem reconhecido comportamento oportunista, são associadas a grande variedade de infecções em animais domésticos, *e.g.*, infecções geniturinárias, pulmonares, umbilicais, ósseas, do conduto auditivo e enterites (QUINN et al., 2011). Em humanos e animais, *Pseudomonas* sp. também se caracterizam por infecções adquiridas em ambientes hospitalares comumente, e, são refratárias aos antimicrobianos convencionais (PACHORI et al., 2019). O micro-organismo está amplamente distribuído no ambiente dos criatórios de animais domésticos (QUINN et al., 2011), fato que favorece infecções de natureza oportunista, principalmente relacionadas a contaminações a partir de ambientes hídricos (SCHAUER et al., 2021), incluindo infecções umbilicais em ruminantes domésticos (CARDONA et al., 2011; FARADONBEH e FARADONBEH, 2016). Mais de 20 espécies de *Pseudomonas* foram identificadas nos animais amostrados, algumas, certamente, descritas pela primeira vez causando infecções umbilicais em cordeiros que, provavelmente, pode ser creditado ao uso no diagnóstico da técnica molecular de espectrometria de massas, que apresenta elevada capacidade de distinção de espécies (GONÇALVES et al., 2014).

A grande variedade de espécies de *Pseudomonas* identificada como agentes primários de infecções umbilicais nos cordeiros do presente estudo indica provável excesso de umidade

e dejetos no ambiente dos animais, que favorecem infecções por este patógeno relacionadas a via hídrica (SCHAUER *et al.*, 2021).

Ao contrário do esperado, as espécies do gênero *Pseudomonas*, obtidas dos cordeiros amostrados, estiveram relacionadas principalmente às infecções umbilicais leves (escore de gravidade 1). Esse resultado nos indica que a gravidade da infecção umbilical, *per si*, não está diretamente relacionada com a presença de bactérias gram-negativas ou gram-positivas.

Os estafilococos e estreptococos se caracterizam como grupo complexo de cocos gram-positivos, que possuem como habitat a pele, mucosas e conjuntivas dos animais e humanos, relacionados a várias manifestações clínicas de caráter purulento (QUINN *et al.*, 2011; MCCULLOCH e MAMIZUCA, 2015). Estudos com cordeiros (HOLMOY *et al.*, 2012; NÓBREGA JÚNIOR *et al.*, 2014; RUTHERFORD *et al.*, 2014) e bezerros (RENGIFO *et al.*, 2006; CARDONA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2022) descreveram os estafilococos e estreptococos como patógenos primários em casos de infecções umbilicais. No entanto, no presente estudo, espécies do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram isoladas em baixa frequência em cultura pura ou associados. Tal variação no isolamento dos patógenos nas infecções umbilicais em ruminantes domésticos pode encontrar justificativa nos procedimentos de manejo, e nas condições ambientais e higiênicas dos animais recém-nascidos, que podem influenciar na exposição da região umbilical aos patógenos no ambiente dos criatórios (FARADONBEH e FARADONBEH, 2016; SALCI *et al.*, 2017; STEERFORTH e WINDEN, 2018). Apesar da baixa frequência, o isolamento de espécies de estafilococos e estreptococos como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros, reforça a necessidade de cuidados com os animais recém-nascidos, em especial na antissepsia umbilical nos primeiros dias de vida (MARTINS *et al.*, 2022), em virtude destes micro-organismos apresentarem como habitat a pele e mucosas (QUINN *et al.*, 2011), incluindo da região umbilical de ruminantes domésticos (MARTINS *et al.*, 2022).

Espécies de *Enterococcus* foram outro grupo de cocos gram-positivos identificados nos cordeiros amostrados, com predomínio de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. gilvus* e *E. gallinarum* isolados em cultura pura ou em associações. Este grupo de bactérias é encontrado na microbiota do sistema digestório dos animais e humanos, e no ambiente de criatórios de animais (QUINN *et al.*, 2011), causando infecções oportunistas, incluindo infecções umbilicais em bezerros (MARTINS *et al.*, 2022), reforçando a complexidade de micro-organismos envolvidos na gênese das onfalopatias infecciosas em ruminantes domésticos.

Em 3,9% (5/128) dos cordeiros amostrados não foi obtido o isolamento microbiano. Resultado similar foi obtido em estudo com infecções umbilicais em bezerros (MARTINS *et al.*, 2022) e pode ser creditado a infecção por micro-organismos que necessitam meios ou condições especiais de isolamento, ou mesmo inflamações de origem asséptica, *i.e.*, traumáticas ou por parasitas (GOMES, 2021), que não foram objeto de diagnóstico no presente estudo.

Foram identificados fungos e leveduras em 10,1% (13/128) e 3,9% (5/128) das amostras de infecção umbilical nos cordeiros. Esse resultado concorda com estudo similar (MARTINS *et al.*, 2022) que também identificou fungos/leveduras em infecções umbilicais em ruminantes domésticos e, apesar da baixa frequência, sugere que este grupo de agentes também devem ser considerados na abordagem diagnóstica de causas primárias de onfalopatias infecciosas em cordeiros.

Posto os prejuízos causados aos produtores decorrentes das infecções umbilicais em cordeiros (WINDEYER *et al.*, 2014; TORA *et al.*, 2021), faz-se necessário adotar medidas para a profilaxia da doença nas fazendas amostradas, incluindo adequada antisepsia umbilical nos primeiros dias pós-parto e ingestão adequada de colostro nas primeiras horas de vida (WINDEYER *et al.*, 2014; FARADONBEH e FARADONBEH, 2016). Ainda, com base nos achados do presente estudo, merecem ênfase ações de profilaxia voltadas ao ambiente, *e.g.*, retirada diária de fezes e matéria orgânica do ambiente dos cordeiros e evitar excesso de umidade no ambiente dos animais, proporcionando ambiente limpo e seco nos criatórios, particularmente para esta categoria animal, em virtude da elevada ocorrência de enterobactérias e de outras bactérias gram-negativas, que possuem como habitat o próprio ambiente das fazendas.

A maioria dos estudos conduzidos no diagnóstico da etiologia das infecções umbilicais em cordeiros em vários países (HOLMOY *et al.*, 2012; NÓBREGA JÚNIOR *et al.*, 2014; FARADONBEH e FARADONBEH, 2016) têm sido baseados em métodos clássicos de identificação fenotípica dos micro-organismos. No entanto, nos animais amostrados, a identificação dos patógenos em nível de espécies foi realizada com base na técnica molecular de espectrometria de massas, fato que pode ser considerado um dos principais diferenciais do presente estudo. O uso da técnica de MALDI-TOF MS possibilitou a identificação fidedigna, com alto poder de distinção de espécies em isolados de origem bacteriana e leveduras (*Candida krusei*, *Wickerhamomyces anomalus*). Ainda, na literatura consultada, várias espécies de micro-organismos foram identificados no presente estudo pela primeira vez como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros com até 30 dias de idade, *e.g.*, *Raoutella terrigena*,

Rahnella aquatilis, *Massilia oculi*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter mucicolens*, *Acinetobacter radioresistens*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter gandavensis*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Leclercia adecarboxyla*, *Siccibacter turicensis*, *Oceanobacillus profundus*, *Wickerhamomyces anomalus*, além de certas espécies do gênero *Pseudomonas*, fato que limitou confrontar este achado com estudos similares.

Alguns autores como Rutherford et al. (2014) no Reino Unido, Ribeiro et al. (2015) no Brasil e Constable et al. (2016) nos EUA referiram *Trueperella pyogenes* como um dos micro-organismos relevantes como agente primário de infecções umbilicais em cordeiros. Contudo, no presente estudo, *T. pyogenes* não foi isolado, que poderia ser creditado a variações de manejo e condições de ambiente dos criatórios amostrados.

No tocante as amostras obtidas dos cordões umbilicais de cordeiros sem sinais aparentes de infecção umbilical, foi isolada também ampla variedade de bactérias, incluindo espécies do gênero *Pseudomonas* e enterobactérias, mas com aumento expressivo de micro-organismos gram-positivos se comparado às amostras obtidas das infecções umbilicais. Neste contexto, destacam-se espécies do gênero *Staphylococcus*, em especial *S. aureus*, patógeno oportunista, com habitat na microbiota de pele e mucosas de mamíferos (WEI et al., 2023). No entanto, *Desemzia incerta* foi o micro-organismo gram-positivo isolado com maior frequência nos animais sem sinais aparentes de infecções umbilicais. Tal micro-organismo tem sido descrito presente em amostras de carnes, peixes, laticínios (BATT e TORTORELLO, 2014) e na cavidade oral de humanos (ADHIKARI et al., 2017), embora não foram encontrados relatos de seu isolamento na espécie ovina.

Para as enterobactérias e espécies de *Pseudomonas* (i.e., bactérias gram-negativas) isoladas de cordeiros com infecção umbilical, a gentamicina revelou >75% de eficácia. Em contraste, para este grupo de agentes, os isolados apresentaram, em geral, >30% de resistência para o florfenicol, ampicilina, oxitetraciclina e sulfa/trimetoprim. De modo similar, a gentamicina, amoxicilina/ácido clavulânico e ceftiofur apresentaram >65% de eficácia para as espécies identificadas dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (i.e., bactérias gram-positivas). No entanto, este grupo de bactérias revelou alta resistência (>30%) para ampicilina e sulfa/trimetoprim. O marbofloxacino se mostrou uma alternativa interessante tanto para o grupo de bactérias gram positivas, quanto para o grupo de gram-negativas. O conjunto destes resultados *in vitro* sugere que a gentamicina, o marbofloxacino e a amoxicilina/ácido clavulânico devem ser considerados como alternativas de fármacos para o tratamento de infecções umbilicais em cordeiros. Não obstante, em geral, os isolados revelaram resistência

(>30%) *in vitro* diante do uso de sulfa/trimetoprim, ampicilina e/ou oxitetraciclina. Tal resultado era esperado, posto que estes fármacos são utilizados há mais de 40 anos para o tratamento de diferentes infecções em ruminantes domésticos, fato que pode aumentar a pressão de seleção para bactérias multirresistentes (GIGUÈRE et al., 2010).

De modo preocupante, 20% dos isolados revelaram multirresistência aos antimicrobianos testados, particularmente bactérias gram-negativas (*e.g.*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e espécies de *Pseudomonas*). A multirresistência bacteriana é considerada problema emergente em saúde única, de âmbito mundial (OMS, 2022; DONKOR et al., 2023), reforçando a necessidade do uso racional de antimicrobianos nas abordagens terapêuticas em animais domésticos, incluindo a adoção de antibioticoterapia, com respaldo em testes *in vitro* de sensibilidade microbiana (GIGUÈRE et al., 2010).

Entre os 128 cordeiros com infecção umbilical, em 47% (60/128) foi possível obter dados de desfecho até 6 meses de idade dos animais. Destes, 58% (35/60) apresentaram sinais clínicos graves (pneumonia, artrite, sepse) sugestivos de complicações secundárias à infecção umbilical, e evoluíram para óbito. Elevada mortalidade relacionada às infecções umbilicais em cordeiros também tem sido relatada em estudos similares no Marrocos (CHAARANI et al., 1991) e reforça a necessidade da adoção de ações rigorosas e sistemáticas para a profilaxia das onfalopatias infecciosas nas fazendas amostradas, em especial relativa à ingestão de colostro nas primeiras horas de vida, antissepsia umbilical e uso racional de antimicrobianos.

A amostragem de conveniência, a impossibilidade de obter dados de desfecho/complicações clínicas de todos os animais amostrados, o diagnóstico de fungos utilizando técnicas exclusivamente fenotípicas e a não investigação de fatores de virulência nos isolados de *E. coli* podem ser considerados limitações do presente estudo.

7. CONCLUSÕES

- ✓ Grande variedade de espécies de micro-organismos, particularmente de origem bacteriana, foram identificados nos animais amostrados, em cultura pura ou em associação, ressaltando a complexidade etiológica e o comportamento oportunista dos patógenos na gênese das infecções umbilicais em cordeiros;
- ✓ Enterobactérias (em especial *E. coli*) e outras bactérias gram-negativas (como espécies de *Pseudomonas*) foram os principais micro-organismos identificados por

- 1019 espectrometria de massas, reforçando a participação desse grupo de bactérias ambientais
1020 como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros;
- 1021 ✓ Foi observada associação significativa entre o isolamento de *E. coli* e a ocorrência de
1022 casos moderados e graves de infecção umbilical em cordeiros, indicando elevada
1023 patogenicidade/ virulência deste patógeno nas onfalopatias em cordeiros;
- 1024
- 1025 ✓ Grande variedade de micro-organismos foram isolados em cordeiros saudáveis, com alta
1026 frequência de bactérias gram-positivas (estafilococos, estreptococos e enterococos),
1027 reforçando a presença destes grupos de micro-organismos como pertencentes a
1028 microbiota de mucosas em animais domésticos, aumento significativo e relevante de
1029 bactérias gram-positivas e diminuição visível do isolamento de enterobactérias.
- 1030
- 1031 ✓ Várias espécies dos gêneros *Raoultella*, *Rahnella*, *Massilia*, *Achromobacter*,
1032 *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Siccibacter*, *Oceanobacillus* e
1033 *Wickerhamomyces* foram identificadas pela primeira vez como agentes primários em
1034 infecções umbilicais em cordeiros devido ao uso no diagnóstico da técnica molecular
1035 de espectrometria de massas, que apresenta alta capacidade de distinção de espécies
1036 bacteriana e leveduras;
- 1037
- 1038 ✓ Gentamicina e marbofloxacina foram os antimicrobianos de melhor eficácia *in vitro*
1039 diante dos micro-organismos isolados e a amoxicilina com ácido clavulânico foi o de
1040 melhor eficácia para bactérias gram-positivas, sugerindo que estes fármacos sejam
1041 considerados em abordagens terapêuticas nas infecções umbilicais em cordeiros;
- 1042 ✓ Alta resistência múltipla aos antimicrobianos (20%) foi observada nos isolados
1043 bacterianos obtidos das infecções umbilicais em cordeiros, particularmente para
1044 ampicilina, sulfa/trimetoprim e tetraciclina, alertando para a necessidade do uso racional
1045 de antimicrobianos no tratamento de infecções em cordeiros;
- 1046 ✓ Elevado desfecho letal (58%) foi observado nos cordeiros amostrados que apresentaram
1047 graves complicações clínicas (poliartrite, pneumonia, sepse) secundárias às infecções
1048 umbilicais, indicando a necessidade de adoção de ações sistemáticas de
1049 profilaxia/controle nos criatórios amostrados nas onfalopatias, em especial, higiene do
1050 ambiente, antisepsia umbilical e adequada ingestão de colostro nos cordeiros recém-
1051 nascidos.
- 1052

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, A.; KURELLA, S.; BENERJEE, P.; MITRA, A. Aerosolized bacteria and microbial activity in dental clinics during cleaning procedures. **Journal of Aerosol Science**, v.114, p.209-218, 2017.
- AGERHOLM, J.S.; BOYE, M.; AALBÆK, B. Ovine fetal necrobacillosis. **Journal of comparative pathology**, v.136, p.231-221, 2007.
- ANDRADE, S.F., GIUFFRIDA, R. Quimioterápicos antimicrobianos e antibióticos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 25-72.
- BARRY, J.; BOKKERS, E.A.M.; SAYERS, R.; MURPHY, J.P.; DE BOER, I.J.M.; KENNEDY, E. Effect of feeding single-dam or pooled colostrum on maternally derived immunity in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.105, p.560-571, 2022
- BATT C.A., TORTORELLO M.L.. **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2nd ed. Academic Press, 2014. 3248p.
- BINNS, S.H.; COX, I.J.; RIZVI, S.; GREEN, L.E. Risk factors for lamb mortality on UK sheep farms. **Preventive veterinary medicine**, v.52, p.287-303, 2002.
- CARDONA Á. J., ÁLVAREZ P. J., & ARRIETA B. G. Aislamiento e identificación de agentes bacterianos productores de onfalitis en terneros del departamento de córdoba. **Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica**. v.14, n. 2, p. 95 – 99, 2011.
- CHAARANI B., ROBINSON R.A. & JOHNSON D.W. Lamb mortality in Meknes province (Morocco). **Prev. Vet. Med.**, v.10, p.283-298, 1991.
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020a). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals** (CLSI VET 015). 5th edition. Wayne, PA. 250p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020b). **Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing**. 30th Edition. Wayne, PA. 332p.
- CONSTABLE P.D., HINCHLIFF K.W., DONE S. & GRUENBERG W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats**. 11th ed. Philadelphia: Saunders Ltd., 2016. 2.278p.
- DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M. **Open Epi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health**; 2013. [2020 Agost 20]. Disponível em: <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>.
- DENAMUR, E.; CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; GORDON, D. The population genetics of pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews. Microbiology**, v.19, p.37-54, 2021.
- DONKOR, G.Y.; ANDERSON, G.M.; STADLER, M.; TAWLAH, P.O.; ORELLANO, C.D.; EDWARDS, K.A.; DAHL, J.U. A novel ruthenium-silver based antimicrobial potentiates

- aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **mSphere**, v.8, p.1-21, 2023
- ELOY, A.M.X.; COSTA, A.L.; CAVALCANTE, A.C.; SILVA, E.; SOUSA, F.B.; SILVA, F.L.R.; ALVES, F.S.F.; VIEIRA, L.S.; BARROS, N.N.; PINHEIRO, R.R. **Criação de ovinos e caprinos**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Brasília, DF. 2007. 98p.
- FARADONBEH, Y. K. & FARADONBEH, M. K. Evaluate the risk factors umbilical cord bacterial infection in calves in Shahrekord city. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 4, n. 2, p. 162-166, 2016.
- GANTER, M. Zoonotic risks from small ruminants. **Veterinary Microbiology**, v.181, p.53-65, 2015.
- GIADINIS, N.D.; LOUKOPOULOS, P.; TSAKOS, P.; KRITSEPI-KONSTANTINOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; KARATZIAS, H. Illthrift in suckling lambs attributed to lung pyogranuloma formation. **Veterinary Medicine International**, v.165, p.165-168, 2011.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING P.M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4.ed. São Paulo: Roca, 2010. 683p.
- GOMES, V. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação de bezerras. **Revista Brasileira de Buiatria**, v.1. n.2, p.1-62, 2021.
- GÖKÇE, E.; ERDOĞAN, H.M. An Epidemiological Study on Neonatal Lamb Health. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v.15, p.225-236, 2009.
- GONÇALVES, J.L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J.R.; BRAGA, P.A.; FERREIRA, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J.P.; EBERLIN, M.N.; DOS SANTOS, M.V. Identification of corynebacterium spp. Isolated from bovine intra-mammary infections by matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v.173, p.147-151, 2014.
- GUNN, A. A.; HOUSE, J.K.; CHUCK, G.; CHIGERWE, M. Initial Management and Clinical Investigation of Neonatal Ruminants. In: SMITH, B. P.; PUSTERLA, N.; VAN METRE, D. C. **Large Animal Internal Medicine**. 5. ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2015. p.286-301.
- HOLMØY, I.H.; KIELLAND, C.; STUBSJØEN, S.M.; HEKTOEN, L.; WAAGE, S. Housing conditions and management practices associated with neonatal lamb mortality in sheep flocks in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**, v.107, p.231-241, 2012.
- HORDOFA, D.; ABUNNA, F.; MEGERSA, B.; ABEBE, R. Incidence of morbidity and mortality in calves from birth to six months of age and associated risk factors on dairy farms in Hawassa city, southern Ethiopia. **Heliyon**, v.7(12), 2021
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, RJ. 50p.
- JANG, J.; HUR, H.G.; SADOWSKY, M.J.; BYAPPANAHALLI, M.N.; YAN, T.; ISHI, S.

- 1125 Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications – A review. **Journal of**
 1126 **Applied Microbiology**, v.123, p.570-581, 2017.
- 1127 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MELO, N.T. **Guia para identificação: Fungos, Actinomicetos e Algas de**
 1128 **Interesse Médico**. São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.
- 1129 LIU, D. **Molecular Detection of Human Fungal Pathogens**. Boca Raton: CRC Press, 2011. 958p.
- 1130 MARTINS, L. S. A.; MOTTA, R.G.; RIBEIRO, M.G. Virulence-encoding genes related to
 1131 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* and multidrug resistance pattern of strains isolated from
 1132 neonatal calves with different severity scores of umbilical infections. **Microbial Pathogenesis**
 1133 **JCR**, v.174, e.105861, 2022
- 1134 MCCULLOCH, H.; MAMIZUCA, E.M. **Microbiologia**. 6th ed. L. R. Trabulsi and F. Alterthum, ed.
 1135 Atheneu, São Paulo, Brazil, 2015.
- 1136 MEE, J.F. Invited review: Bovine neonatal morbidity and mortality-Causes, risk factors, incidences,
 1137 sequelae, and prevention. **Reproduction in Domestic Animals**, v.58, n.2, p.15-22, 2023.
- 1138 NÓBREGA JR, J.E.; MEDEIROS, J.M.; DAMASCENO, M. M.; PINTO, C.W.C. Mortalidade de
 1139 cordeiros e cabritos por infecção não específicas no Sertão e Cariri Paraibano. **Tecnologia e**
 1140 **Ciência Agropecuária**, p.79-82, 2014.
- 1141 OLIVEIRA, A.M. **Avaliação de protocolos utilizados na cicatrização umbilical de bezerros**.
 1142 Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Medicina Veterinária) - Universidade Federal da
 1143 Paraíba, 2017. 39p.
- 1144 OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de
 1145 vigilância de uso Antimicrobiano. Genebra: OMS, 2022.
- 1146 PACHORI, P., GOTHALWAL, R., & GANDHI, P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas*
 1147 *aeruginosa* in intensive care unit; a critical review. **Genes & diseases**, v.6(2), p.109–119, 2019.
- 1148 PETRINI, L. E.; PETRINI, O. **Identifying moulds: a practical guide**. Stuttgart: J. Cramer, 2013.
- 1149 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN,
 1150 P.J. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 2. ed. Wiley-Blackwell, UK, 2011. p.334-
 1151 341, 2011.
- 1152 RATANAPOB, N.; VANLEEUEWEN, J.; MCKENNA, S.; WICHTEL, M.; STRYHN, H.;
 1153 RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C.; MENZIES, P.; WICHTEL, J. Management factors associated
 1154 with perinatal lamb mortality in Prince Edward Island flocks. *Preventive Veterinary Medicine*,
 1155 v.180, p., 2020.
- 1156 REIS, A.S.B.; PINHEIRO, C. P.; LOPES, C. T.A.; CERQUEIRA, V.D.; OLIVEIRA, C. M. C.;
 1157 DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Onfalopatias em bezerros de rebanhos leiteiros no Nordeste do
 1158 estado do Pará. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, p.29-34, 2009.

- 1159 RENGIFO, S. A.; SILVA, R. A.; PEREIRA, I. A.; ZEGARRA, J. Q.; SOUZA, M. M.; BOTTEON, R.
 1160 C. C. M. Isolamento de agentes microbianos a partir de amostras de sangue e umbigo de bezerros
 1161 mestiços neonatos. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 43, n. 4, p.
 1162 442-447, 2006.
- 1163 RIBEIRO, M.G.; RISSETI, R.M.; BOLAÑOS, C.A.D.; CAFFARO, K.A.; MORAIS, A.C.B.; LARA,
 1164 G.H.B.; ZAMPROGNA, T.O.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P.; FRANCO, M.M.J. *Trueperella*
 1165 *pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to
 1166 2012). **The Veterinary Quarterly**, v.35, p.82-87, 2015.
- 1167 ROBINSON, A.L.; TIMMS, L.L.; STALDER, K.J.; TYLER, H.D. Short communication: The effect of
 1168 4 antiseptic compounds on umbilical cord healing and infection rates in the first 24 hours in dairy
 1169 calves from a commercial herd. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.5726–5728, 2015.
- 1170 RODRIGUES, C.A.; SANTOS, P.S.P.; PERRI, S.H.V.; TEODORO, P.H.M. ... VIANA FILHO, M.N.
 1171 Correlação entre os métodos de concepção, ocorrência e formas de tratamento das onfalopatias em
 1172 bovinos: estudo retrospectivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.618-622, 2010.
- 1173 RUTHERFORD, S.J.; RYCROFT, A.N.; RIDLER, A.L. Sources of *Streptococcus dysgalactiae* in
 1174 English and welsh sheep flocks affected by infectious arthritis (joint ill). **The Veterinary Record**,
 1175 v.174, p.579, 2014.
- 1176 SADAN, M. Superficial swellings in sheep (*Ovis aries*) and goats (*Capra hircus*): Clinical and
 1177 ultrasonographic findings. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.81, p.1326-1333, 2019.
- 1178 SALCI H, OZDEMIR SALCI E.S, OZAKIN C, SEYREK INTAS K. A brief study on hematological,
 1179 sero-biochemical and microbiological results of umbilical lesions in calves. **International Journal**
 1180 **of Veterinary Science**, v. 6, p.86–89, 2017.
- 1181 SANTANA, R.C.M.; ESTEVES, S.N.; CHAGAS, A.C.S. Circular Técnica 73. Embrapa - Pecuária
 1182 Sudeste. **Cuidados com o Cordeiro**, 2015. 9p.
- 1183 SANTOS, E. D. ONFALOPATIAS EM BEZERRAS LEITEIRAS: REVISÃO
 1184 BIBLIOGRÁFICA. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Zootecnia) – Faculdade de
 1185 Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
 1186 Jaboticabal, SP, 2021. 64p.
- 1187 SAROWSKA, J.; FUTOMA-KOLOCH, B.; JAMA-KMIECIK, A.; FREJ-MADRZAK, M.;
 1188 KSIAZCZYK, M.; BUGLA-PLOSKONSKA, G.; CHOROSZY-KROL, I. Virulence factors,
 1189 prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from
 1190 different sources: recent reports. **Gut Pathogens**, v.11, p., 2019.
- 1191 SATO, R.; YAMADA, K.; YOKOYAMA T.; TANIMOTO, K.; TAKEUCHI, S.; TATSUZAWA, N.;
 1192 NAKUI, S.; SATOH, H.; FADUL, M.; STEINER A. Partial hepatectomy for treatment of multiple
 1193 liver abscess in a calf: a case report. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p., 2021.

- SCHAUER, B.; WALD, R.; URBANTKE, V.; LONCARIC, I.; BAUMGARTNER, M. Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. **Animals**, v.11, p.279, 2021.
- SCOTT, L.C.; MENZIES, P.I. Antimicrobial resistance and small ruminant veterinary practice. **Veterinary clinics of North America: food animal practice**, v.27, p.23-32, 2011.
- SMITH, G.W.; HOUSE, J.K.; GUNN, A.A.; MCGUIRK, S.M.; IZZO, M. Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. In: SMITH, B. P.; PUSTERLA, N.; VAN METRE, D. C. **Large Animal Internal Medicine**. 5.ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2015. p.302-338.
- SMISTAD, M.; TOLLERSRUD, T.S.; AUSTBØ, L.; PORCELLATO D.; WOLFF, C.; ASAL, B.; PHYTHIAN, C.J.; OPPEGAARD, O.; JØRGENSEN, H.J. Molecular detection and genotype characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from sheep flocks with outbreaks of infectious arthritis. *Veterinary Microbiology*, v. 262, p., 2021.
- STEERFORTH, D.D.; VAN WINDEN, S. Development of clinical sign-based scoring system for assessment of omphalitis in neonatal calves. **Veterinary Record**, v.182, p.549-563, 2018.
- SUN, W.; QIAN, X.; WANG, X.; GU, J. Residual enrofloxacin in cattle manure increased persistence and dissemination risk of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion. **Journal of Environmental Management**, v.326, p., 2023.
- TORA, E.; ABAYNEH, E.; SEYOUM, W.; SHURBE, M. Longitudinal study of calf morbidity and mortality on smallholder farms in southern Ethiopia. **PLoS One**, v.16, e)257139, 2021.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 920p.
- UNDERWOOD, W.J.; BLAUWIEKEL, R.; DELANO, M.L.; GILLESBY, R.; MISCHLER, S.A.; SCHOELL, A. Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). In: FOX, J.J.; OTTO, G.M.; WHARY, M.T.; ANDERSON, L.C.; PRITCHETT- CORNING, K.R. **Laboratory animal medicine**. 3.ed. Academic Press, 2015. p. 623-694.
- VAN CAMP, M.B.; WINDER, C.B.; GOMEZ, D.E.; DUFFIELD, T.F.; SAVOR, N.K.; RENAUD, D.L. Evaluating the effectiveness of a single application of 7% iodine tincture umbilical dip as a prevention of infection of the external umbilical structures in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v.105, n.7, p.6083-6093, 2022.
- VAN DEN BROM, R.; DE JONG, A.; VAN ENGELEN, E.; HEUVELINK, A.; VELLEMA, P. Zoonotic risks of pathogens from sheep and their milk borne transmission. **Small Ruminant Research**, v.189, e:106123, 2020.
- WEI, M.; FLOWERS, L.; KNIGHT, S.A.B; ZHENG, Q.I.; MURGA-GARRIDO, S.; UBEROI, A.; PAN, J.T.C; WALSH, J.; SCHROEDER, E.; CHU, E.W.; CAMPBELL, A.; SHIN, D.; BRADLEY, C.W.; DURAN-STRUUCK, R.; GRICE, E.A.; MCMAHON, K. Harnessing diversity and antagonism within the pig skin microbiota to identify novel mediators of colonization resistance to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **mSphere**, v.8, p., 2023.

- 1230 WIELAND, M.; MANN, S.; GUARD, C.L.; NYDAM, D.V. The influence of 3 different navel dips on
1231 calf health, growth performance, and umbilical infection assessed by clinical and ultrasonographic
1232 examination. **Journal of Dairy Science**, v.100, p.513-524, 2016.
- 1233 WINDEYER, M.C., LESLIE, K. E.; GODDEN, S. M.; HODGINS, D. C.; LISSEMORE, K. D.;
1234 LEBLANC, S.J. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up
1235 to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v.113, p.231–240, 2014.
- 1236

1237 **Anexo I** - Atestado de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



ATESTADO

Atesto que o Projeto "Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de infecções umbilicais em borregos diagnosticados por espectrometria de massas." **Protocolo CEUA 0260/2022**, a ser conduzido por Thais Spessotto Bello, responsável/orientador Márcio Garcia Ribeiro, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	18/01/2023 a 29/02/2024
Nome Comum / Espécie / Linhagem	OVINA / OVIS ARIES / Animais de corte.
Raça	Sem raça definida.
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	60
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	8kg
Idade	0 ano(s) e 2 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Animais de propriedades de São Paulo e Paraná

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 07/11/2022

JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof. Dr. Walter Maurício Corrêa, s/n
UNESP - Campus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
(14) 3890-2176 - patrizia@fmvz.unesp.br - www.fmvz.unesp.br

Trabalho a ser enviado para a Revista Pesquisa Veterinária Brasileira. As orientações para submissão estão descritas no link: <http://www.pvb.com.br/assets/doc/Normas-para-autores-PVB-portugues-16.08.2023.pdf>

Etiology and antimicrobial resistance in isolates from lamb's umbilical infection diagnosed by mass spectrometry

Thaís Spessotto Bello¹, Márcio Garcia Ribeiro^{1*}

ABSTRACT. – Bello, T.S., Ribeiro, M.G. 2024. **Etiology and antimicrobial resistance in isolates from lamb's umbilical infection diagnosed by mass spectrometry.** *Pesquisa Veterinária Brasileira.*

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa s/n, Cx. Postal 560, Botucatu, SP 18618-681, Brazil. E-mail: marcio.ribeiro@unesp.br

The first months after birth are considered critical in the life of the sucking lamb, due to the high occurrence of mortality secondary to umbilical infections, commonly related to inadequate consumption of colostrum, deficiencies in postpartum umbilical antisepsis, and maintenance of newborn animals in environments with dirt and moisture. The present study investigated the bacterial and fungi etiology of umbilical infections in suckling lambs, the clinical scores of umbilical severity of infections and multidrug resistance of isolates. Were aseptically collected 128 and 41 umbilical samples from diseased and apparently healthy lambs, respectively. All samples were subjected to microbiological culture, antimicrobial susceptibility pattern, and identification of agents based on mass spectrometry. Two hundred and fourteen bacteria and yeast species were identified among diseased lambs and 116 bacterial species from apparently healthy animals. Enterobacteria group (87/214=41%), particularly *Escherichia coli* (24/214=11%) showed significant association ($p<0,05$) in lambs with higher scores at clinical severity. Among healthy umbilical samples, a set of bacteria was identified, particularly *Desemzia incerta* (14/116=12%). In animals with umbilical infection, gentamicin was the most effective antimicrobial (106/131=81%) in gram-negative bacteria. Among the gram-positive micro-organisms, ceftiofur was the most effective (8/9=89%). Multidrug resistance was observed among 20% (36/182) of lambs with umbilical infections. A variety of bacteria and yeasts were identified among animals sampled, either in pure culture or in coinfections/cooccurrence, highlighting the nature of umbilical infections in lambs, with a predominance of Enterobacteria group, and the need to adopt measures to control/prevent the disease in farms.

***Keywords:** infectious omphalopathies, lambs, etiology, bacterial resistance, MALDI-TOF MS

RESUMO. – [Etiologia microbiana e multirresistência aos antimicrobianos em isolados obtidos de

infecções umbilicais em cordeiros diagnosticados por espectrometria de massas.] Os primeiros meses após o nascimento são críticos na vida do cordeiro pela elevada ocorrência de mortalidade secundária às infecções umbilicais, relacionadas ao consumo inadequado de colostro, deficiências na antisepsia umbilical pós-parto e manutenção dos animais recém-nascidos em ambientes com sujidades e umidade. O presente estudo investigou a etiologia microbiana das infecções umbilicais em cordeiros, os escores de gravidade clínica das lesões e a ocorrência de multirresistência dos isolados aos antimicrobianos. Foram coletados suabes umbilicais de 128 cordeiros com sinais clínicos de infecções umbilicais e de 41 cordeiros hígidos. Os suabes foram submetidos ao cultivo microbiológico, teste de sensibilidade microbiana *in vitro* e identificação dos micro-organismos por espectrometria de massas. Foram identificados 214 micro-organismos (bactérias e leveduras) em amostras de infecção umbilical e 116 isolados em cordeiros sadios. Nos casos de infecções umbilicais, foi observado predomínio do grupo das enterobactérias

¹Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil;

*Corresponding author: marcio.ribeiro@unesp.br

(87/214=41%), com associação significativa ($p<0,05$) da *Escherichia coli* (24/214=11%) em cordeiros com escores maiores de gravidade clínica. Em cordeiros saudáveis, ampla variedade de bactérias foi isolada com número expressivo de micro-organismos gram-positivos, com predomínio de *Desemzia incerta* (14/116=12%). Nas infecções umbilicais envolvendo bactérias gram-negativas, gentamicina foi o antimicrobiano mais efetivo (106/131=81%). Para as bactérias gram-positivas, o ceftiofur apresentou boa eficácia (8/9=89%). A multirresistência bacteriana foi observada em 20% (36/182) dos isolados obtidos de infecção umbilical. Grande variedade de espécies de bactérias e leveduras foram identificadas nos animais amostrados, ressaltando a complexidade etiológica das infecções umbilicais em cordeiros, com predomínio de enterobactérias, e a necessidade de adoção de ações de profilaxia/controlar a doença nos criatórios.

Palavras-chave: onfalopatias infecciosas, cordeiros, etiologia, resistência bacteriana, MALDI-TOF MS

INTRODUCTION

A produção de produtos e subprodutos de origem ovina tem aumentado em todo o mundo, incluindo carne, leite e produção de lã, particularmente por consumidores adeptos ao sabor da carne ovina ou intolerantes ao leite bovino. Estima-se que o Brasil detenha cerca de 21,5 milhões de ovinos, concentrados principalmente nas regiões nordeste e sul do país (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE, 2022).

Os processos infecciosos estão entre as principais causas de morbimortalidade nos primeiros três meses de vida dos ruminantes (Holmøy et al., 2012; Nóbrega Jr. et al., 2014; Tora et al., 2021; Mee, 2023). Em bezerros, a taxa de morbidade por enfermidades infecciosas neste período pode atingir 73% dos animais. Entre as principais infecções em cordeiros merece destaque as onfalopatias infecciosas, que podem evoluir para complicações pulmonares, articulares, abscessos em órgãos e septicemias, com elevada mortalidade. Estima-se entre 6% e 31,3% a mortalidade de cordeiros relacionadas às infecções umbilicais (Holmøy et al., 2012).

A inadequada transferência de imunidade passiva pelo colostro é considerado o principal fator de risco de mortalidade em cordeiros por causas infecciosas (incluindo umbilicais) (Binns et al., 2002; Barry et al., 2022), aliada às deficiências na antisepsia umbilical no pós-parto imediato, nascimento de animais fracos, má nutrição, e a permanência dos animais recém-nascidos em ambientes sujos, úmidos, com excesso de matéria orgânica (fezes) e variações bruscas de temperatura (Giadinis et al., 2011; Nóbrega Jr. et al., 2014; Wieland et al., 2016). Hordofa et al. (2021) referiram que, nas regiões de clima tropical, a temperatura e a umidade favorecem a transmissão e a multiplicação de micro-organismos patogênicos, favorecendo infecções em ruminantes domésticos nos primeiros meses de vida.

Cordeiros acometidos por infecções nos primeiros meses de idade impactam negativamente a produção, pois se tornam animais fracos, apresentam menor peso corporal (com consequente menor remuneração pela carcaça), e requerem gastos adicionais com assistência e tratamento (Robinson et al., 2015).

As onfalopatias de origem infecciosa em ruminantes domésticos - incluindo cordeiros - apresentam etiologia complexa, principalmente de origem bacteriana, com predomínio de enterobactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*), estafilococos, estreptococos e certos actinomicetos (*Trueperella pyogenes*) (Holmøy et al., 2012; Rutherford et al., 2014; Nóbrega Jr. et al., 2014; Ribeiro et al., 2015; Constable et al., 2016; Martins et al., 2022).

As infecções umbilicais em ruminantes domésticos ocorrem por via ascendente, a partir do contato do resquício do cordão umbilical com sujidades, matéria orgânica, solo, fezes e utensílios de uso comum (Windeyer et al., 2014; Constable et al., 2016; Gomes, 2021). Os patógenos se estabelecem primariamente na região umbilical dos cordeiros e, comumente, se disseminam para outros órgãos, causando pneumonia, (poli)artrite, abscessos em órgãos, encefalites e/ou sepse, com prognóstico reservado e alta mortalidade neonatal (Nóbrega Júnior et al., 2014; Sato et al., 2021; Smistad et al., 2021).

Edema, dor à palpação e hiperemia do umbigo, com ou sem secreção purulenta aparente, representam os sinais clínicos mais comuns das onfalopatias de origem infecciosa em ruminantes domésticos (Rutherford et al., 2014; Steerforth e Van Winden, 2018), embora, frequentemente, os animais evoluam para sinais sistêmicos decorrentes da disseminação dos patógenos (Holmøy et al., 2012; Nóbrega Júnior et al., 2014). Em bezerros bovinos, a gravidade das lesões umbilicais é classificada em escores: 1 (leve), 2 (moderada) e 3 (grave) (Rodrigues et al., 2010; Steerforth e Van Winden, 2018).

O diagnóstico de rotina das infecções umbilicais em cordeiros é baseado nos achados clínico-epidemiológicos, incluindo o exame físico do umbigo e parâmetros fisiológicos dos animais, além do cultivo microbiológico dos agentes (Underwood et al., 2015; Steerforth; Van Winden, 2018). No entanto, o

diagnóstico em nível de espécies dos agentes etiológicos identificados em infecções umbilicais em cordeiros tem sido fundamentado usualmente em testes fenotípicos convencionais (Rutherford et al., 2014; Nóbrega Júnior et al., 2014; Ribeiro et al., 2015).

O tratamento das infecções umbilicais em cordeiros tem sido baseado em antimicrobianos de amplo espectro, com apresentação por via sistêmica, em virtude dos riscos de disseminação linfo-hematógena dos patógenos (Scott et al., 2011; Holmøy et al., 2012; Nóbrega Júnior et al., 2014; Underwood et al., 2015).

Apesar do impacto econômico decorrente das complicações clínicas e mortalidade de cordeiros secundárias às infecções umbilicais, estudos compreensivos sobre onfalopatias infecciosas em cordeiros estão praticamente restritos a espécie bovina (Steerforth e Winden, 2018; Tora et al., 2021; Martins et al., 2022) e a descrição de relatos de casos em ovinos com diagnóstico dos agentes baseados em testes fenotípicos convencionais (Binns et al., 2002; Reis et al., 2009; Nóbrega Júnior et al., 2014; Underwood et al., 2015). Ainda, na literatura consultada, não foram encontrados estudos que avaliassem a gravidade clínica das infecções umbilicais em cordeiros, tampouco a associação dos escores de gravidade das onfalopatias com os agentes etiológicos. Neste cenário, o presente estudo investigou a etiologia microbiana das infecções umbilicais em cordeiros diagnosticada por espectrometria de massas (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* – MALDI TOF MS), os escores de gravidade clínica das lesões umbilicais e a ocorrência de multirresistência *in vitro* dos isolados aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento da afecção.

MATERIALS AND METHODS

Animal Ethics and Use Committee (CEUA). O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, sob o número 0260/2022 (Anexo I).

Samples collection. Foram coletados suabes de secreções umbilicais de cordeiros naturalmente infectados com sinais de onfalopatia e de cordeiros recém-nascidos sem sinais de infecção umbilical, provenientes de animais dos estados de São Paulo, Paraná e Pernambuco, entre os meses de agosto de 2022 a janeiro de 2024.

Como fatores de inclusão dos cordeiros e propriedades rurais utilizadas no estudo, foram adotados os seguintes critérios: 1) presença de piquetes maternidades, 2) não realização de terapia antimicrobiana sete dias anterior a colheita das amostras umbilicais, 3) idade máxima de 60 dias para os animais com infecções umbilicais, 4) idade máxima de um dia para o grupo de animais sem sinais aparentes de infecção umbilical.

Alguns produtores realizavam apenas a criação de ovinos, mas, na maioria das propriedades amostradas, a ovinocultura não era a única atividade realizada, pois havia criação simultânea de bovinos, equinos, suínos e galinhas.

Os animais utilizados no presente estudo permaneceram alojados segundo o sistema de criação de cada propriedade, não havendo interferência na rotina e manejo, constituídos em sua maioria, de sistemas de produção extensivos e sem manejo de cura umbilical.

Os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais dos cordeiros foram adaptados do proposto por Rodrigues *et al.* (2010) e Steerforth e Winden (2018), para bezerros, conforme segue:

Grau 0 (normal): estruturas umbilicais em processo de involução, sem dor, aumento de volume ou outros sinais de infecção ou inflamação. Cordeiro aparentemente sadio;

Grau 1 (infecção umbilical leve): dor à palpação, aumento de temperatura local, endurecimento e/ou aumento do diâmetro do coto umbilical (espessura maior que um lápis ou 6mm). Cordeiro sem outros sinais clínicos;

Grau 2 (infecção umbilical moderada): presença de pus e aumento da espessura umbilical (> 6mm);

Grau 3 (infecção umbilical grave): sinais de grau 2 supracitados aliados ao aumento da temperatura retal (40°C), sinais sistêmicos (febre, letargia, apatia, taquicardia, taquipneia, inapetência ou anorexia) ou presença de hérnia.

Foram obtidos também dados de prováveis complicações dos casos de infecção umbilical (*i.e.*, artrite, pneumonia, sepse) e desfecho (morte ou cura), até seis meses após a colheita do material umbilical.

Com o cordeiro posicionado em decúbito lateral, e após prévia antissepsia da pele e região periférica do umbigo com gaze embebida com solução de álcool (70%) e iodo (2%), foram colhidas amostras de secreção umbilical utilizando suabe esterilizado. Os suabes foram introduzidos completamente nos umbigos dos animais e, em seguida, armazenado em meio de transporte Stuart, mantidos em condições de refrigeração (4°C a 8°C) em caixa isotérmica e elemento gelado. Todas as amostras umbilicais foram colhidas por médicos veterinários treinados, incluindo na identificação dos escores de gravidade clínica e processadas no Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia da FMVZ- UNESP/Botucatu-SP.

Microbiological and fungal cultures. As amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e ágar MacConkey em condições de aerobiose, a 37°C, mantidas por 72 horas. Simultaneamente, as amostras foram cultivadas em ágar suplementado com sangue bovino (5%) desfibrinado e caldo cérebro coração (BHI), incubadas em condições de anaerobiose, a 37°C e mantidas por 96 horas. Os micro-organismos foram preliminarmente identificados em nível de gênero segundo aspecto das colônias e morfotintoriais dos micro-organismos (coloração de Gram) (Quinn et al., 2011), reisolados e mantidos em condição de refrigeração até o envio para diagnóstico por espectrometria de massas.

Além do cultivo bacteriológico, os suabes de todos os animais foram semeados em tubos de vidro com tampa de cortiça contendo ágar Sabouraud-dextrose, suplementado com 0,5% de cloranfenicol. Os tubos foram incubados a 37°C e examinados a cada 3 dias, por até 25 dias. Colônias com aspecto fúngico ou leveduriforme foram classificadas em nível de gênero segundo características macromorfológicas (aparência das colônias) e micromorfológicas (observação em microscopia óptica dos micro-organismos a partir de lâminas de microcultivos em ágar batata-dextrose). A classificação das espécies foi baseada em chaves taxonômicas para fungos ambientais contaminantes e de interesse médico (Lacaz, 1998; Petrini; Petrini, 2013). Testes fenotípicos adicionais - baseados na utilização de diferentes substratos, fermentação ou assimilação de açúcares - foram adotados para a classificação fúngica (LIU, 2011).

Foram considerados com infecção umbilical, animais com ≥ 5 unidades formadoras de colônias (UFC) (Martins et al., 2022).

In vitro microbial susceptibility profile. Todos os isolados de origem bacteriana foram submetidos ao teste padrão de difusão com discos conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI (CLSI, 2020a,b) utilizando nove antimicrobianos de sete classes, utilizados no tratamento de afecções bacterianas em cordeiros, a saber: 1) aminoglicosídeos (gentamicina 10 µg), 2) anfenicóis (florfenicol 30 µg), 3) cefalosporinas (ceftiofur 30 µg), 4) fluorquinolonas (enrofloxacino 5 µg e marbofloxacino 5 µg), 5) penicilinas semissintéticas e naturais (ampicilina 10 µg, amoxicilina / ácido clavulânico 10 µg), 6) tetraciclina (oxitetraciclina 30 µg) e 7) sulfonamidas (sulfametoxazol/trimetoprim 25µg).

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Todos os isolados de origem bacteriana e leveduras foram submetidos à técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF) no laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP/Pirassununga, SP. Para tanto, após o primeiro isolamento, as colônias eram diferenciadas fenotípicamente, reisoladas e mantidas em condições de refrigeração até o recultivo, com objetivo de envio de cultivos recentes (24-48h), com grande massa bacteriana, para a realização da espectrometria de massas. Entre 3 e 4 colônias recém isoladas (24-48h) em ágar sangue e/ou MacConkey foram submetidas à extração com 20-40 µL de ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a formação dos espectros bacterianos. Após ~15 minutos, foi adicionado - em cada amostra - 20-40 µL de acetomil (100% P.A.) na mesma proporção de ácido fórmico (1:1) e as amostras centrifugadas. Em seguida, foi adicionado 1µL de solução matriz (ácido 2-ciano- 4-hidroxicinâmico com diluição a 50% de acetomil e 2,5% de ácido trifluoracético). As placas foram então dipostas no recipiente do aparelho MALDI-TOF MS (Bruker e Daltonics™, Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos espectros foram analisados entre 2000-20.000m/z, utilizando o software FlexControl 3.3. O diagnóstico em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerado para espectros $\geq 1,7$ e $\geq 2,0$, respectivamente (Gonçalves et al., 2014). Todos os isolados com resultado “não identificado” foram submetidos a um reteste.

Statistical analysis. O cálculo do tamanho amostral foi realizado para estimar a prevalência associada a uma margem de erro. Estimou-se a prevalência de 4% de infecções umbilicais em cordeiros (Erdoğan e Gökçe, 2009). Utilizando o software OpenEpi (versão 3.0), com intervalo de confiança de 95,0% e erro absoluto de 5%, foi estimada a colheita de, no mínimo, 60 cordeiros com sinais de infecção umbilical para a condução do estudo. A colheita de animais sem sinais aparentes de infecção umbilical foi realizada, por conveniência, nas mesmas propriedades com animais clinicamente infectados.

A associação entre a ocorrência dos diferentes agentes e os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, comparando as medianas dos escores de gravidade clínica para cada grupo ou patógenos de especial interesse identificados com a gravidade do caso, considerando significante valores de $p < 0,05$ (Dean et al., 2013).

Os grupos ou micro-organismos de especial interesse foram subdivididos conforme segue: enterobactérias, *E.coli*, *Pseudomonas* spp., enterococos, estafilococos, estreptococos, actinomicetos e miscelânea.

Foi realizado o pós teste de Dunn para as combinações que apresentaram associações estatísticas.

RESULTS

Lambs sampled data. Foram coletados suabes umbilicais de 128 cordeiros com sinais de infecção e 41 de cordeiros recém-nascidos (um dia) sem sinais de infecção umbilical. As amostras de animais infectados foram provenientes dos estados de São Paulo (44/128= 34,4%), do Paraná (74/128= 57,8%) e de Pernambuco (10/128= 7,8%). Das 41 amostras de animais sem sinais de infecção umbilical, 21 foram coletadas no estado de São Paulo (21/41=51%) e 20 no estado do Paraná (20/41= 49%).

Dos 128 cordeiros com sinais de infecção, 54% (68/126) eram fêmeas e 46% (58/126) eram machos, com idade variando entre 0 e 30 dias (média de 6,5 dias). Em seis animais não foi possível obter a informação de idade e em dois não foram informados dados de gênero. Dos cordeiros amostrados com sinais de infecção umbilical e dados de idade, 69% (84/122) possuíam entre 0 e 7 dias e 31% (38/122) entre 8 e 30 dias. Dos 41 cordeiros sem sinais de infecção, 54% (22/41) eram fêmeas e 46% (19/41) eram machos, até um dia de nascimento.

Dos 128 cordeiros com sinais de infecção, 25 (25/124=20%) pertenciam à raça Texel, 25 (25/124=20%) Santa Inês, 17 Dorper (17/124=14%) e 1 Berganês (1/124=0,8%) Ainda, 45,2% (56/124) foram informados como sem raça definida e em 4 animais não estavam disponíveis dados de raça. Entre os 41 cordeiros sem sinais de infecção umbilical, 7 (7/22=32%) pertenciam à raça Texel, 6 (6/22=27%) Santa Inês, 4 (4/22=18%) Lacaune, 3 (3/22=13%) Dorper e 2 (2/22=10%) Suffolk. Em 19 animais sem sinais aparentes de infecção umbilical não estavam disponíveis dados de raça.

Dentre os escores de gravidade clínica das infecções umbilicais, 44,5% (57/128) dos animais apresentaram infecções leves (grau 1), 35% (45/128) moderadas (grau 2) e 20,5% (26/128) graves (grau 3). Além dos sinais de infecção umbilical, 16,5% (21/128) dos animais apresentaram diarreia, 15% (19/128) pneumonia, 8,5% (11/128) sinais septicêmicos (febre, taquicardia, dispneia) e/ou 7% (9/128) artrite. Dos 60 animais (60/128=47%) com sinais compatíveis com complicações dos casos de infecção umbilical, 58% (35/60) evoluíram para óbito.

Isolation of microorganisms of bacterial and fungal origin. Das 128 amostras umbilicais com sinais de infecção foram isolados 214 micro-organismos (entre bactérias e leveduras). A frequência de micro-organismos isolados em cultura pura ou coinfeções nos animais estão sumariadas nas Tabelas 1 e 2.

Os principais micro-organismos isolados e identificados por espectrometria de massas nas amostras de infecção umbilical foram enterobactérias e outras bactérias gram-negativas, a saber: *Escherichia coli* (24/214=11,21%), *Serratia marcescens* (8/214=3,74%), *Raoultella terrigena* (7/214=3,27%), *Aeromonas hydrophila* (6/214=2,80%), *Pseudomonas koreensis* (6/214=2,80%), *Enterobacter kobei* (6/214=2,80%), *Hafnia alvei* (5/214=2,34%), *Klebsiella oxytoca* (5/165=2,34%) e *Pseudomonas* sp. (5/214=2,34%). Do total de agentes isolados em cultura pura, 12,62% (27/214) não foram identificados pelo MALDI-TOF MS (Tabela 1).

Foram observadas coinfeções em 67 amostras (67/128= 52,34%) de animais com infecção umbilical, das quais foram encontradas 60 associações distintas de micro-organismos. As associações mais frequentes foram: *Enterococcus faecium* + *Escherichia coli* (4/67=6%), *Hafnia alvei* + *Klebsiella oxytoca* (2/67=3%), *Pseudomonas* sp. + *Candida krusei* (2/67=3%), *Escherichia coli* + não identificado (2/67=3%) e *Aeromonas hydrophila* + não identificado (2/67=3%) (Tabela 2).

Do total de amostras processadas, 3,9% (5/128) foram negativas para o isolamento microbiano. Nas amostras obtidas de cordeiros sadios, em apenas uma (1/41=2,4%) não foram isolados micro-organismos.

Nos cordeiros com sinais de infecção umbilical, 44% (56/128) apresentaram escore de gravidade clínica leve (grau 1), 35% (45/128) moderada (grau 2) e 21% (27/128) grave (grau 3).

Entre as enterobactérias e outras bactérias gram-negativas houve predomínio de *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp. Nas infecções por *E. coli*, 17% (4/24) apresentaram escore de gravidade clínica leve (grau 1), 50% (12/24) escore moderado (grau 2) e 33% (8/24) escore grave (grau 3). Nas infecções por *Pseudomonas* spp, 43,2% (19/42) foram classificadas como escore leve (grau 1); 34,1% (15/44) escore moderado (grau 2) e 22,7% (10/44) escore grave (grau 3).

Dos 41 animais sem sinais de infecção umbilical foram isolados e identificados por espectrometria de massas 116 micro-organismos. A frequência de micro-organismos isolados em cultura pura e co-ocorrência nos animais sem sinais aparentes de infecção umbilical, estão sumariadas nas Tabelas 3 e 4. Nestes animais, os principais micro-organismos isolados foram *Desemzia incerta* (14/116=12,1%), *Pantoea* sp. (8/116=6,9%), *Pantoea agglomerans* (5/116= 4,3%), *Pseudomonas koreensis* (4/116= 3,4%), *Pseudomonas stutzeri* (4/116= 3,4%), *Serratia fonticola* (4/116= 3,4%) e *Staphylococcus succinus* (4/116= 3,4%).

Não foram isoladas colônias sugestivas de *Clostridium* sp. ou outros anaeróbios estritos, tanto nas infecções umbilicais, quanto nas amostras provenientes de animais sem sinais de onfalopatias.

Foram isolados fungos filamentosos de 13 amostras de animais com sinais de infecção umbilical. Os fungos identificados foram: *Aspergillus* sp. (5/13=38,5%), *Aspergillus niger* (1/13=7,7%), *Aspergillus clavatus* (1/13=7,7%), *Mucor* sp. (1/13=7,7%) e *Geotrichum* sp. (1/13=7,7%). Quatro fungos retornaram como não identificados (4/13=30,7%).

In vitro microbial susceptibility test of the isolates. Os resultados do perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* para os principais grupos ou micro-organismos de especial interesse identificados em cordeiros com infecção umbilical estão sumariados na Tabela 5.

A gentamicina foi o fármaco mais efetivo diante das infecções por bactérias do gênero *Pseudomonas* (39/44=89%). Em contraste, as espécies de *Pseudomonas* apresentaram maior resistência para sulfametoxazole/trimetoprim (20/44=45%).

Para as enterobactérias, marbofloxacino (77/87=88%), gentamicina (67/87=77%) e sulfametoxazole/trimetoprim (66/87=76%) foram os antimicrobianos mais efetivos. Em contraste, alta resistência dos isolados foi observada para a ampicilina (66/87=75%), a amoxicilina/ácido clavulânico (43/87=49,5%) e para o florfenicol (41/87=47%).

Para o grupo dos enterococos, amoxicilina/ácido clavulânico foi o antimicrobiano mais efetivo (13/17=76%), enquanto os isolados apresentaram maior resistência para o enrofloxacino (13/17=76%).

Marbofloxacino (6/6=100%), ceftiofur (5/6=83%) e gentamicina (5/6=83%) foram os antimicrobianos mais efetivos para os estafilococos. Em contraste, os isolados foram resistentes principalmente à ampicilina (3/6=50%), apesar do pequeno número de estafilococos testados.

Os estreptococos apresentaram 100% (3/3) de sensibilidade à amoxicilina/ácido clavulânico e ao ceftiofur, enquanto 67% (2/3) deste grupo de bactérias foram resistentes ao enrofloxacino, apesar do pequeno número de estreptococos testados (Tabela 5).

A multirresistência bacteriana foi observada em 36 (36/182=20%) dos isolados com sinais de infecção umbilical. A resistência múltipla aos antimicrobianos foi observada com maior frequência em isolados de *Escherichia coli* (10/24=41%), *Enterococcus faecium* (5/7=71%) e *Serratia marcescens* (2/8=25%). Do total de 36 isolados multidroga resistentes, 27 (27/36=75%) eram bactérias gram-negativas.

Os resultados de perfil de sensibilidade microbiano *in vitro* das 41 amostras colhidas de cordeiros sem sinais de infecção umbilical estão sumariados na Tabela 6.

Para *Pseudomonas* sp., gentamicina (26/26=100%) e enrofloxacino (16/26=62%) foram os fármacos mais efetivos.

Gentamicina (8/8=100%) e marbofloxacino (8/8=100%) foram os antimicrobianos mais efetivos para os estafilococos, enquanto a maior resistência dos isolados foi observada para sulfametoxazole/trimetoprim (3/8=37,5%), apesar do número reduzido de estafilococos.

Gentamicina (31/32=97%), florfenicol (30/32=94%) e marbofloxacino (30/32=94%) apresentaram boa eficácia para as enterobactérias.

No grupo miscelânea, oxitetraciclina (33/35=94%), amoxicilina/ácido clavulânico (32/35=91%), ampicilina (32/35=91%) e florfenicol (32/35=91%) foram os fármacos mais efetivos, enquanto os isolados revelaram maior resistência ao enrofloxacino (18/35=51%).

Statistical analysis. A figura 1 confronta os principais grupos de micro-organismos identificados nos animais com infecção umbilical e os escores de gravidade clínica. Foi possível observar associação significativa ($p=0,0039$) entre as medianas dos animais com identificação de *E. coli* e escores 2 e 3 de gravidade clínica das infecções umbilicais, em comparação com as medianas dos demais grupos de micro-organismos.

A figura 2 apresenta a frequência dos escores de gravidade clínicas das infecções umbilicais dos cordeiros, segundo os diferentes grupos/agentes identificados. Notar que *E. coli* revelou maior frequência de escores de gravidade 2 e 3, em detrimento de infecções de gravidade 1.

DISCUSSION

No presente estudo foi observada elevada complexidade de espécies bacterianas em infecções umbilicais de cordeiros com até 30 dias de idade, com avaliação dos escores clínicos de gravidade das onfalopatias, nos quais *E. coli* apresentou associação significativa com escores moderados e graves. Grande complexidade de bactérias foi encontrada também em amostras umbilicais de cordeiros com até um dia, sem sinais de infecção umbilical, com predomínio de bactérias gram-positivas.

Ainda, 20% dos isolados bacterianos obtidos de animais de infecção umbilical foram multirresistentes aos antimicrobianos, indicando a necessidade do uso racional de fármacos na abordagem terapêutica das onfalopatias em cordeiros. Em 60 (47%) dos cordeiros que foi possível obter informações de desfecho, 58% evoluíram para óbito provavelmente por complicações clínicas secundárias às infecções umbilicais, reforçando os prejuízos nos criatórios com as onfalopatias infecciosas, fato que pode ser considerado uma das principais motivações do presente estudo.

As infecções umbilicais em ruminantes domésticos apresentam etiologia multifatorial (Gomes, 2021), embora predominantemente de origem infecciosa (Cardona *et al.*, 2011; Holmoy *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2022), e estão relacionadas a prejuízos significativos aos produtores, principalmente secundários às complicações sistêmicas (Windeyer *et al.*, 2014; Tora *et al.*, 2021). Ocorrem por via ascendente, pelo contato do umbigo com o solo e sujidades presentes no ambiente, ou provenientes da própria microbiota umbilical (Windeyer *et al.*, 2014; Constable *et al.*, 2016; Gomes, 2021), e estão intimamente relacionadas à baixa imunidade do cordeiro devido à baixa ingestão ou à má qualidade do colostro ingerido, e antisepsia inadequada do cordão umbilical nos primeiros dias após o nascimento (Giadinis *et al.*, 2011; Nóbrega Jr. *et al.*, 2014; Gunn *et al.*, 2015; Ratanapob, *et al.*, 2020).

Grande complexidade de micro-organismos de origem bacteriana foi identificada nos 128 cordeiros com infecções umbilicais amostrados, com predomínio de enterobactérias (40,5%), particularmente *E. coli*, reforçando o impacto desta espécie bacteriana na gênese dos casos, e a necessidade de adoção de ações controle nas infecções umbilicais em cordeiros, com ênfase em medidas profiláticas para agentes provenientes do próprio ambiente dos criatórios.

No presente estudo, *E. coli* foi o agente mais frequentemente isolado (11,21%) das infecções umbilicais dos cordeiros. Este resultado concorda com estudos similares no Brasil (Nóbrega Jr *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2022) e Irã (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016) e reafirma a relevância de *E.coli* como agente primário de onfalopatias em cordeiros.

As enterobactérias representaram os micro-organismos isolados em maior frequência nos animais amostrados com infecção umbilical, em cultura ou em associação, com destaque para as espécies dos gêneros *Escherichia*, *Serratia*, *Raoultella*, *Hafnia*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, além de outros gram-negativos como espécies de *Pseudomonas*. O predomínio de enterobactérias e outros patógenos gram-negativos nas infecções umbilicais nos cordeiros amostrados concorda com estudos similares conduzidos com cordeiros na Noruega (Holmoy *et al.*, 2012) e Brasil (Nóbrega Júnior *et al.*, 2014), bem como em bezerros na Colômbia (Cardona *et al.*, 2011), Iran (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016) e Brasil (Martins *et al.*, 2022). Tal achado

pode ser creditado a elevada exposição do umbigo, nos primeiros dias pós-parto, a patógenos que possuem como habitat o solo, fezes, matéria orgânica e água, particularmente as enterobactérias (Quinn et al., 2011; Steerforth e Windem, 2018).

E. coli pertence ao complexo grupo das enterobactérias, caracterizadas pela elevada versatilidade e adaptabilidade a diferentes biomas, alta diversidade genética, clonal e de fatores de virulência, além da resistência aos antimicrobianos convencionais (Jang et al., 2017; Denamur et al., 2021). *E. coli* patogênicas são classicamente subdivididas em entéricas e extraentéricas (ExPEC), e apresentam grande complexidade de fatores de virulência, incluindo produção de toxinas, fímbrias/adесinas, fatores de captação de ferro, invasinas e resistência ao soro (Jang et al., 2017; Sarowska et al., 2019; Denamur et al., 2021). Porém, não foram investigados nos cordeiros amostrados com infecção umbilical a ocorrência de genes relacionados a virulência de *E. coli*, particularmente ExPEC, fato que pode ser considerado uma limitação do presente estudo.

A padronização dos escores de gravidade clínica dos casos de infecções umbilicais de bezerros tem sido objeto de estudos nas últimas duas décadas (Steerforth e Windem, 2018). Entre os 128 animais do presente estudo, 57 (44,5%), 45 (35%) e 26 (20,5%) foram classificados com escores 1 (leve), 2 (moderada) ou 3 (grave) de gravidade clínica das infecções umbilicais, respectivamente. Particularmente nas infecções por *E. coli*, 83% (20/24) apresentaram escores de gravidade 2 e 3, com associação significativa ($p=0,0039$) entre as medianas dos animais com infecções por *E. coli* e as medianas observadas nos demais grupos de bactérias, sugerindo que infecções por *E. coli* sejam de alta patogenicidade.

Outras enterobactérias identificadas nos animais amostrados foram representadas por espécies do gênero *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Providencia*, *Proteus* e *Pantoea*. Tal achado reforça a complexidade etiológica e o impacto de bactérias de origem entérica, com habitat ambiental, como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros e, à semelhança dos bezerros, provavelmente são adquiridas pela elevada exposição da região umbilical à matéria orgânica, fezes, solo, terra, água ou utensílios contaminados do próprio ambiente dos animais (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016; Martins et al., 2022).

Espécies de *Pseudomonas* corresponderam a 20,5% dos casos de onfalite. Este grupo de bactérias gram-negativas, de reconhecido comportamento oportunista, são associadas a grande variedade de infecções em animais domésticos, e.g., infecções geniturinárias, pulmonares, umbilicais, ósseas, do conduto auditivo e enterites (Quinn et al., 2011). Em humanos e animais, *Pseudomonas* sp. também se caracterizam por infecções adquiridas em ambientes hospitalares comumente, e, são refratárias aos antimicrobianos convencionais (Pachori et al., 2019). O micro-organismo está amplamente distribuído no ambiente dos criatórios de animais domésticos (Quinn et al., 2011), fato que favorece infecções de natureza oportunista, principalmente relacionadas a contaminações a partir de ambientes hídricos (Schauer et al., 2021), incluindo infecções umbilicais em ruminantes domésticos (Cardona et al., 2011; Faradonbeh e Faradonbeh, 2016). Mais de 20 espécies de *Pseudomonas* foram identificadas nos animais amostrados, algumas, certamente, descritas pela primeira vez causando infecções umbilicais em cordeiros que, provavelmente, pode ser creditado ao uso no diagnóstico da técnica molecular de espectrometria de massas, que apresenta elevada capacidade de distinção de espécies (Gonçalves et al., 2014).

A grande variedade de espécies de *Pseudomonas* identificada como agentes primários de infecções umbilicais nos cordeiros do presente estudo indica provável excesso de umidade e dejetos no ambiente dos animais, que favorecem infecções por este patógeno relacionadas a via hídrica (Schauer et al., 2021).

Ao contrário do esperado, as espécies do gênero *Pseudomonas*, obtidas dos cordeiros amostrados, estiveram relacionadas principalmente às infecções umbilicais leves (escore de gravidade 1). Esse resultado nos indica que a gravidade da infecção umbilical, *per si*, não está diretamente relacionada com a presença de bactérias gram-negativas ou gram-positivas.

Os estafilococos e estreptococos se caracterizam como grupo complexo de cocos gram-positivos, que possuem como habitat a pele, mucosas e conjuntivas dos animais e humanos, relacionados a várias manifestações clínicas de caráter purulento (Quinn et al., 2011; McCulloch e Mamizuca, 2015). Estudos com cordeiros (Holmoy et al., 2012; Nóbrega Júnior et al., 2014; Rutherford et al., 2014) e bezerros (Rengifo et al., 2006; Cardona et al., 2011; Martins et al., 2022) descreveram os estafilococos e estreptococos como patógenos primários em casos de infecções umbilicais. No entanto, no presente estudo, espécies do gênero *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram isoladas em baixa frequência em cultura pura ou associados. Tal variação no isolamento dos patógenos nas infecções umbilicais em ruminantes domésticos pode encontrar justificativa nos procedimentos de manejo, e nas condições ambientais e higiênicas dos animais recém-nascidos, que podem influenciar na exposição da região umbilical aos patógenos no ambiente dos criatórios (Faradonbeh e Faradonbeh, 2016; SALCI et al., 2017; Steerforth e Windem, 2018). Apesar da baixa frequência, o isolamento de espécies de estafilococos e estreptococos como agentes primários de infecções

umbilicais em cordeiros, reforça a necessidade de cuidados com os animais recém-nascidos, em especial na antissepsia umbilical nos primeiros dias de vida (Martins *et al.*, 2022), em virtude destes micro-organismos apresentarem como habitat a pele e mucosas (Quinn *et al.*, 2011), incluindo da região umbilical de ruminantes domésticos (Martins *et al.*, 2022).

Espécies de *Enterococcus* foram outro grupo de cocos gram-positivos identificados nos cordeiros amostrados, com predomínio de *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. gilvus* e *E. gallinarum* isolados em cultura pura ou em associações. Este grupo de bactérias é encontrado na microbiota do sistema digestório dos animais e humanos, e no ambiente de criatórios de animais (Quinn *et al.*, 2011), causando infecções oportunistas, incluindo infecções umbilicais em bezerros (Martins *et al.*, 2022), reforçando a complexidade de micro-organismos envolvidos na gênese das onfalopatias infecciosas em ruminantes domésticos.

Em 3,9% (5/128) dos cordeiros amostrados não foi obtido o isolamento microbiano. Resultado similar foi obtido em estudo com infecções umbilicais em bezerros (Martins *et al.*, 2022) e pode ser creditado a infecção por micro-organismos que necessitam meios ou condições especiais de isolamento, ou mesmo inflamações de origem asséptica, *i.e.*, traumáticas ou por parasitas (Gomes, 2021), que não foram objeto de diagnóstico no presente estudo.

Foram identificados fungos e leveduras em 10,1% (13/128) e 3,9% (5/128) das amostras de infecção umbilical nos cordeiros. Esse resultado concorda com estudo similar (Martins *et al.*, 2022) que também identificou fungos/leveduras em infecções umbilicais em ruminantes domésticos e, apesar da baixa frequência, sugere que este grupo de agentes também devem ser considerados na abordagem diagnóstica de causas primárias de onfalopatias infecciosas em cordeiros.

Posto os prejuízos causados aos produtores decorrentes das infecções umbilicais em cordeiros (Windeyer *et al.*, 2014; Tora *et al.*, 2021), faz-se necessário adotar medidas para a profilaxia da doença nas fazendas amostradas, incluindo adequada antissepsia umbilical nos primeiros dias pós-parto e ingestão adequada de colostro nas primeiras horas de vida (Windeyer *et al.*, 2014; Faradonbeh e Faradonbeh, 2016). Ainda, com base nos achados do presente estudo, merecem ênfase ações de profilaxia voltadas ao ambiente, *e.g.*, retirada diária de fezes e matéria orgânica do ambiente dos cordeiros e evitar excesso de umidade no ambiente dos animais, proporcionando ambiente limpo e seco nos criatórios, particularmente para esta categoria animal, em virtude da elevada ocorrência de enterobactérias e de outras bactérias gram-negativas, que possuem como habitat o próprio ambiente das fazendas.

A maioria dos estudos conduzidos no diagnóstico da etiologia das infecções umbilicais em cordeiros em vários países (Holmoy *et al.*, 2012; Nóbrega Júnior *et al.*, 2014; Faradonbeh e Faradonbeh, 2016) têm sido baseados em métodos clássicos de identificação fenotípica dos micro-organismos. No entanto, nos animais amostrados, a identificação dos patógenos em nível de espécies foi realizada com base na técnica molecular de espectrometria de massas, fato que pode ser considerado um dos principais diferenciais do presente estudo. O uso da técnica de MALDI-TOF MS possibilitou a identificação fidedigna, com alto poder de distinção de espécies em isolados de origem bacteriana e leveduras (*Candida krusei*, *Wickerhamomyces anomalus*). Ainda, na literatura consultada, várias espécies de micro-organismos foram identificados no presente estudo pela primeira vez como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros com até 30 dias de idade, *e.g.*, *Raoutella terrigena*, *Rahnella aquatilis*, *Massilia oculi*, *Achromobacter mucicolens*, *Achromobacter mucicolens*, *Acinetobacter radioresistens*, *Arthrobacter globiformis*, *Arthrobacter gandavensis*, *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera cryocrescens*, *Leclercia adecarboxyla*, *Siccibacter turicensis*, *Oceanobacillus profundus*, *Wickerhamomyces anomalus*, além de certas espécies do gênero *Pseudomonas*, fato que limitou confrontar este achado com estudos similares.

Alguns autores como Rutherford *et al.* (2014) no Reino Unido, Ribeiro *et al.* (2015) no Brasil e Constable *et al.* (2016) nos EUA referiram *Trueperella pyogenes* como um dos micro-organismos relevantes como agente primário de infecções umbilicais em cordeiros. Contudo, no presente estudo, *T. pyogenes* não foi isolado, que poderia ser creditado a variações de manejo e condições de ambiente dos criatórios amostrados.

No tocante as amostras obtidas dos cordões umbilicais de cordeiros sem sinais aparentes de infecção umbilical, foi isolada também ampla variedade de bactérias, incluindo espécies do gênero *Pseudomonas* e enterobactérias, mas com aumento expressivo de micro-organismos gram-positivos se comparado às amostras obtidas das infecções umbilicais. Neste contexto, destacam-se espécies do gênero *Staphylococcus*, em especial *S. aureus*, patógeno oportunista, com habitat na microbiota de pele e mucosas de mamíferos (Wei *et al.*, 2023). No entanto, *Desemzia incerta* foi o micro-organismo gram-positivo isolado com maior frequência nos animais sem sinais aparentes de infecções umbilicais. Tal micro-organismo tem sido descrito presente em amostras de carnes, peixes, laticínios (Batt e Tortorello, 2014) e na cavidade oral de humanos (Adhikari *et al.*, 2017), embora não foram encontrados relatos do isolamento na espécie ovina.

Para as enterobactérias e espécies de *Pseudomonas* (i.e., bactérias gram-negativas) isoladas de cordeiros com infecção umbilical, a gentamicina revelou >75% de eficácia. Em contraste, para este grupo de agentes, os isolados apresentaram, em geral, >30% de resistência para o florfenicol, ampicilina, oxitetraciclina e sulfa/trimetoprim. De modo similar, a gentamicina, amoxicilina/ácido clavulânico e ceftiofur apresentaram >65% de eficácia para as espécies identificadas dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (i.e., bactérias gram-positivas). No entanto, este grupo de bactérias revelou alta resistência (>30%) para ampicilina e sulfa/trimetoprim. O conjunto destes resultados *in vitro* sugere que a gentamicina, amoxicilina/ácido clavulânico e ceftiofur devem ser considerados como alternativas de fármacos para o tratamento de infecções umbilicais em cordeiros. Não obstante, em geral, os isolados revelaram resistência (>30%) *in vitro* diante do uso de sulfa/trimetoprim, ampicilina e/ou oxitetraciclina. Tal resultado era esperado, posto que estes fármacos são utilizados há mais de 40 anos para o tratamento de diferentes infecções em ruminantes domésticos, fato que pode aumentar a pressão de seleção para bactérias multirresistentes (Giguère et al., 2010).

De modo preocupante, 20% dos isolados revelaram multirresistência aos antimicrobianos testados, particularmente bactérias gram-negativas (e.g., *E. coli*, *K. pneumoniae* e espécies de *Pseudomonas*). A multirresistência bacteriana é considerada problema emergente em animais e humanos, de âmbito mundial (OMS, 2022; Donkor et al., 2023), reforçando a necessidade do uso racional de antimicrobianos nas abordagens terapêuticas em animais domésticos, incluindo a adoção de antibioticoterapia, com respaldo em testes *in vitro* de sensibilidade microbiana (Giguère et al., 2010).

Entre os 128 cordeiros com infecção umbilical, em 47% (60/128) foi possível obter dados de desfecho até 6 meses de idade dos animais. Destes, 58% (35/60) apresentaram sinais clínicos graves (pneumonia, artrite, seps) sugestivos de complicações secundárias à infecção umbilical, e evoluíram para óbito. Elevada mortalidade relacionada às infecções umbilicais em cordeiros também tem sido relatada em estudos similares no Marrocos (Chaarani et al., 1991) e reforça a necessidade da adoção de ações rigorosas e sistemáticas para a profilaxia das onfalopatias infecciosas nas fazendas amostradas, em especial relativa à ingestão de colostro nas primeiras horas de vida, antisepsia umbilical e uso racional de antimicrobianos.

A amostragem de conveniência, a impossibilidade de obter dados de desfecho/complicações clínicas de todos os animais amostrados, o diagnóstico de fungos utilizando técnicas exclusivamente fenotípicas e a não investigação de fatores de virulência nos isolados de *E. coli* podem ser considerados limitações do presente estudo.

CONCLUSION

Grande variedade de espécies de bactérias, leveduras e fungos foram identificados nos animais amostrados, em cultura pura ou em associação, ressaltando a complexidade etiológica e o comportamento oportunista dos patógenos na gênese das infecções umbilicais em cordeiros;

Enterobactérias (em especial *E. coli*) e outras bactérias gram-negativas (como espécies de *Pseudomonas*) foram os principais micro-organismos identificados por espectrometria de massas, reforçando a participação desse grupo de bactérias ambientais como agentes primários de infecções umbilicais em cordeiros;

Foi observada associação significativa entre o isolamento de *E. coli* e a ocorrência de casos moderados e graves de infecção umbilical em cordeiros, indicando elevada patogenicidade/ virulência deste patógeno nas onfalopatias em cordeiros;

Grande variedade de micro-organismos foram isolados em cordeiros sadios, com alta frequência de bactérias gram-positivas (estafilococos, estreptococos e enterococos), reforçando a presença destes grupos de micro-organismos como pertencentes a microbiota de mucosas em animais domésticos, aumento significativo e relevante de bactérias gram-positivas e diminuição visível do isolamento de enterobactérias;

Gentamicina e ceftiofur foram os antimicrobianos de melhor eficácia *in vitro* diante dos micro-organismos isolados, sugerindo que estes fármacos sejam considerados em abordagens terapêuticas nas infecções umbilicais em cordeiros;

Alta resistência múltipla aos antimicrobianos (20%) foi observada nos isolados bacterianos obtidos das infecções umbilicais em cordeiros, particularmente para ampicilina, sulfa/trimetoprim e tetraciclina,

540 alertando para a necessidade do uso racional de antimicrobianos no tratamento de infecções em
541 cordeiros;

542 Elevado desfecho letal (58%) foi observado nos cordeiros amostrados que apresentaram graves
543 complicações clínicas (poliartrite, pneumonia, sepse) secundárias às infecções umbilicais, indicando a
544 necessidade de adoção de ações sistemáticas de profilaxia/controlar nos criatórios amostrados nas
545 onfalopatias, em especial, higiene do ambiente, antisepsia umbilical e adequada ingestão de colostro nos
546 cordeiros recém-nascidos.

547 Acknowledgments

548 Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
549 (FAPESP; protocolo 2021/15085-8) e da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
550 Superior (CAPES).

551 Conflicts of interest statement

552 Os autores declaram não existir conflito de interesse.

554 REFERENCES

- 555
556 Adhikari, A.; Kurella, S.; Benerjee, P.; Mitra, A. 2017. Aerosolized bacteria and microbial activity in dental
557 clinics during cleaning procedures. *J. Aerosol Sci.* 114: 209-218.
- 558 Barry, J.; Bokkers, E.A.M.; Sayers, R.; Murphy, J.P.; De Boer, I.J.M.; Kennedy, E. 2022. Effect of feeding single-
559 dam or pooled colostrum on maternally derived immunity in dairy calves. *J. dairy sci.* 105: 560-571
- 560 Batt C.A., Tortorello M.L. 2002. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2nd ed. Academic Press, 2014. 3248p.
- 561 Binns, S.H.; Cox, I.J.; Rizvi, S.; Green, L.E. Risk factors for lamb mortality on UK sheep farms. *Prev. Vet. Med.*
562 52: 287-303
- 563 Cardona Á. J., Álvarez P. J., & Arrieta B. G. 2011. Aislamiento e identificación de agentes bacterianos
564 productores de onfalitis en terneros del departamento de córdoba. *Revista U.D.C.A Actualidad &*
565 *Divulgación Científica*. 14 (2): 95 – 99.
- 566 Chaarani B., Robinson R.A. & Johnson D.W. Lamb mortality in Meknes province (Morocco). *Prev. Vet. Med.* 10:
567 283-298.
- 568 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020a). *Performance Standards for Antimicrobial*
569 *Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals (CLSI VET 015)*. 5th edition.
570 Wayne, PA. 250p.
- 571 Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2020b). *Performance Standards of Antimicrobial*
572 *Susceptibility Testing*. 30th Edition. Wayne, PA. 332p.
- 573 Constable P.D., Hinchliff K.W., Done S. & Gruenberg W. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases*
574 *of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Ltd., 2016. 2.278p.
- 575 Dean, A.G.; Sullivan, K.M.; Soe, M.M. 2013. *Open Epi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public*
576 *Health*. [2020 Agost 20]. Disponível em: <https://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>.
- 577 Denamur, E.; Clermont, O.; Bonacorsi, S.; Gordon, D. 2021. The population genetics of pathogenic
578 *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 19: 37-54.
- 579 Donkor, G.Y.; Anderson, G.M.; Stadler, M.; Tawlah, P.O.; Orellano, C.D.; Edwards, K.A.; Dahl, J.U. 2023. A
580 novel ruthenium-silver based antimicrobial potentiates aminoglycoside activity against
581 *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere*. 8: 1-21.
- 582 Faradonbeh, Y. K. & Faradonbeh, M. K. 2016. Evaluate the risk factors umbilical cord bacterial infection in
583 calves in Shahrekord city. *J. Entomol. Zool. Stud.* 4 (2): 162-166.
- 584 Giadinis, N.D.; Loukopoulos, P.; Tsakos, P.; Kritsepi-Konstantinou, M.; Kaldrymidou, E.; Karatzias, H. 2011.
585 Illthrift in suckling lambs attributed to lung pyogranuloma formation. *Vet. Med. Int.* 165: 165-168.
- 586 Giguère, S.; Prescott, J.F.; Baggot, Jd.; Walker, Rd.; Dowling Pm. *Terapia antimicrobiana em medicina*
587 *veterinária*. 4.ed. São Paulo: Roca, 2010. 683p.
- 588
589
590 Gomes, V. 2021. Doenças na fase de aleitamento e práticas de manejo sanitário na criação de bezerras.

591 Revista Brasileira de Buiatria. 1 (2): 1-62.

592 Gökçe, E.; Erdoğan, H.M.2009. An Epidemiological Study on Neonatal Lamb Health. Kafka Üniversitesi
593 Veteriner Fakültesi Dergisi. 15: 225-236.

594 Gonçalves, J.L.; Tomazi, . T.; Barreiro, J.R.; Braga, P.A.;Ferreira, R.; Araújo Júnior, J.P.; Eberlin, M.N.2014.
595 Dos Santos, M.V. Identification of corynebacterium spp. Isolated from bovine intra-mammary
596 infections by matrix-assisted laser desorption ionization-timeoff light mass spectrometry. Vet.
597 Microbiol. 173: 147-151.

598 Gunn, A. A.; House, J.K.; Chuck, G.; Chigerwe, M. Initial Management and Clinical Investigation of Neonatal
599 Ruminants. In: SMITH, B. P.; PUSTERLA, N.; VAN METRE, D. C. Large Animal Internal Medicine. 5. ed.
600 St. Louis: Elsevier Mosby, 2015. p.286- 301.

601 Holmøy, I.H.; Kielland, C.; Stubbsjøen, S.M.; Hektoen, L. 2012. Waage, S. Housing conditions and management
602 practices associated with neonatal lamb mortality in sheep flocks in Norway. Prev. Vet. Med. 107: 231-
603 241.

604 Hordofa, D.; Abunna, F.; Megersa, B.; Abebe, R. 2021. Incidence of morbidity and mortality in calves from
605 birth to six months of age and associated risk factors on dairy farms in Hawassa city, southern Ethiopia.
606 Heliyon. 7(12).
607

608 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa da Pecuária Municipal. Rio de
609 Janeiro, RJ. 50p.

610 Jang, J.; Hur, H.G.; Sadowsky, M.J.; Byappanahalli, M.N.; Yan, T.; Ishi, S. 2017. Environmental *Escherichia*
611 *coli*: ecology and public health implications – A review. J. Appl. Microbiol. 123: 570-581.

612 Lacaz, C.S.; Porto, E.; Melo, N.T. Guia para identificação: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico.
613 São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.

614 Liu, D. Molecular Detection of Human Fungal Pathogens. Boca Raton: CRC Press, 2011. 958p.

615 Martins, L. S. A.; Motta, R.G.; Ribeiro, M.G. 2022. Virulence-encoding genes related to extraintestinal
616 pathogenic *Escherichia coli* and multidrug resistance pattern of strains isolated from neonatal calves
617 with different severity scores of umbilical infections. Microb. Pathog JCR. 174: e.105861.

618 McCulloch, H.; Mamizuca, E.M. Microbiologia. 6th ed. L. R. Trabulsi and F. Alterthum, ed. Atheneu, São
619 Paulo, Brazil, 2015.

620 Mee, J.F.2023. Invited review: Bovine neonatal morbidity and mortality-Causes, risk factors, incidences,
621 sequelae, and prevention. Reprod. Domest. Anim. 58 (2): 15-22.

622 Nóbrega Jr, J.E.; Medeiros, J.M.; Damasceno, M. M.; Pinto, C.W.C. 2014. Mortalidade de cordeiros e cabritos
623 por infecção não específicas no Sertão e Cariri Paraibano. Tecnologia e Ciência Agropecuária. 79-82.

624 OMS. Organização Mundial de Saúde. Relatório global de resistência antimicrobiana e sistema de vigilância
625 de uso Antimicrobiano. Genebra: OMS, 2022.

626 Pachori, P., Gothwal, R., & Gandhi, P.2019. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in
627 intensive care unit; a critical review. Genes & diseases. 6(2): 109–119.

628 Petrini, L. E.; Petrini, O. 2013. Identifying moulds: a practical guide. Stuttgart: J. Cramer.

629 Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Leonard, F.C.; Fitzpatrick, E.S.; Fanning, S.; Hartigan, P.J. Veterinary Microbiology
630 and Microbial Disease, 2. ed. Wiley-Blackwell, UK, 2011. p.334-341, 2011.

631 Ratanapob, N.; Vanleeuwen, J.; Mckenna, S.; Wichtel, M.; Stryhn, H.; Rodriguez-Lecompte, J.C.; Menzies, P.;
632 Wichtel, J. 2020. Management factors associated with perinatal lamb mortality in Prince Edward Island
633 flocks. Prev. Vet. Med. 180.

634 Reis, A.S.B.; Pinheiro, C. P.; Lopes, C. T.A.; Cerqueira, V.D.; Oliveira, C. M. C.; Duarte, M. D.; Barbosa, J. D. 2009.
635 Onfalopatias em bezerros de rebanhos leiteiros no Nordeste do estado do Pará. CAB. 1: 29-34.

636 Rengifo, S. A.; Silva, R. A.; Pereira, I. A.; Zegarra, J. Q.; Souza, M. M.; Botteon, R. C. C. M. 2006. Isolamento de
637 agentes microbianos a partir de amostras de sangue e umbigo de bezerros mestiços neonatos. Braz J
638 Vet Res Anim Sci. 43 (4): 442-447.

639 Ribeiro, M.G.; Riseti, R.M.; Bolaños, C.A.D.; Caffaro, K.A.; Morais, A.C.B.; Lara, G.H.B.; Zamprogna, T.O.; Paes,
640 A.C.; Listoni, F.J.P.; Franco, M.M.J. 2015. *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic
641 animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). Vet Q. 35: 82-87.

- Robinson, A.L.; Timms, L.L.; Stalder, K.J.; Tyler, H.D. 2015. Short communication: The effect of 4 antiseptic compounds on umbilical cord healing and infection rates in the first 24 hours in dairy calves from a commercial herd. *J. dairy sci.* 98: 5726–5728.
- Rodrigues, C.A.; Santos, P.S.P.; Perri, S.H.V.; Teodoro, P.H.M.; Viana Filho, M.N. 2010. Correlação entre os métodos de concepção, ocorrência e formas de tratamento das onfalopatias em bovinos: estudo retrospectivo. *Pesq. Vet. Bras.* 30: 618-622.
- Rutherford, S.J.; Rycroft, A.N.; Ridler, A.L. 2014. Sources of *Streptococcus dysgalactiae* in English and welsh sheep flocks affected by infectious arthritis (joint ill). *Vet Rec.* 174: 579.
- Salci H, Ozdemir Salci E.S, Ozakin C, Seyrek Intas K. A. 2017. brief study on hematological, sero-biochemical and microbiological results of umbilical lesions in calves. *Int. J. Vet. Sci.* 6: 86–89.
- Sarowska, J.; Futoma-Koloch, B.; Jama-Kmiecik, A.; Frej-Madrzak, M.; Ksiazczyk, M.; Bugla-Ploskonska, G.; Choroszy-Krol, I. 2019. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut Pathogens.* 11.
- Sato, R.; Yamada, K.; Yokoyama T.; Tanimoto, K.; Takeuchi, S.; Tatsuzawa, N.; Nakui, S.; Satoh, H.; Fadul, M.; Steiner A. 2021. Partial hepatectomy for treatment of multiple liver abscess in a calf: a case report. *BMC Vet. Res.* 17.
- Schauer, B.; Wald, R.; Urbantke, V.; Loncaric, I.; Baumgartner, M. 2021. Tracing Mastitis Pathogens—Epidemiological Investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* Mastitis Outbreak in an Austrian Dairy Herd. *Animals.* 11: 279.
- Scott, L.C.; Menzies, P.I. 2011. Antimicrobial resistance and small ruminant veterinary practice. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 27: 23-32.
- Smith, G.W.; House, J.K.; Gunn, A.A.; McGuirk, S.M.; Izzo, M. Manifestations and management of disease in neonatal ruminants. *In: Smith, B. P.; Pusterla, N.; Van Metre, D. C. Large Animal Internal Medicine.* 5.ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2015. p.302-338.
- Smistad, M.; Tollersrud, T.S.; Austbø, L.; Porcellato D.; Wolff, C.; Asal, B.; Phythian, C.J.; Oppegaard, O.; Jørgensen, H.J. 2018. Molecular detection and genotype characterization of *Streptococcus dysgalactiae* from sheep flocks with outbreaks of infectious arthritis. *Veterinary Microbiology*, v. 262, p., 2021.
- Steerforth, D.D.; Van Winden, S. Development of clinical sign-based scoring system for assessment of omphalitis in neonatal calves. *Vet. Rec.* 182: 549-563.
- Tora, E.; Abayneh, E.; Seyoum, W.; Shurbe, M. 2021. Longitudinal study of calf morbidity and mortality on smallholder farms in southern Ethiopia. *PLoS One.* 16, e)257139.
- Underwood, W.J.; Blauwiel, R.; Delano, M.L.; Gillesby, R.; Mischler, S.A.; Schoell, A. Biology and Diseases of Ruminants (Sheep, Goats, and Cattle). *In: Fox, J.J.; Otto, G.M.; Whary, M.T.; Anderson, L.C.; Pritchett-Corning, K.R. Laboratory animal medicine.* 3.ed. Academic Press, 2015. p. 623-694.
- Wei, M.; Flowers, L.; Knight, S.A.B; Zheng, Q.I.; Murga-Garrido, S.; Uberoi, A.; Pan, J.T.C; Walsh, J.; Schroeder, E.; Chu, E.W.; Campbell, A.; Shin, D.; Bradley, C.W.; Duran-Struuck, R.; Grice, E.A.; McMahon, K. 2023. Harnessing diversity and antagonism within the pig skin microbiota to identify novel mediators of colonization resistance to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *mSphere.* 8.
- Wieland, M.; Mann, S.; Guard, C.L.; Nydam, D.V. 2016. The influence of 3 different navel dips on calf health, growth performance, and umbilical infection assessed by clinical and ultrasonographic examination. *J. dairy sci.* 100: 513-524.
- Windeyer, M.C., Leslie, K. E.; Godden, S. M.; Hodgins, D. C.; Lissemore, K. D.; Leblanc, S.J. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev. Vet. Med.* 113: 231–240.

688

Figure Legends

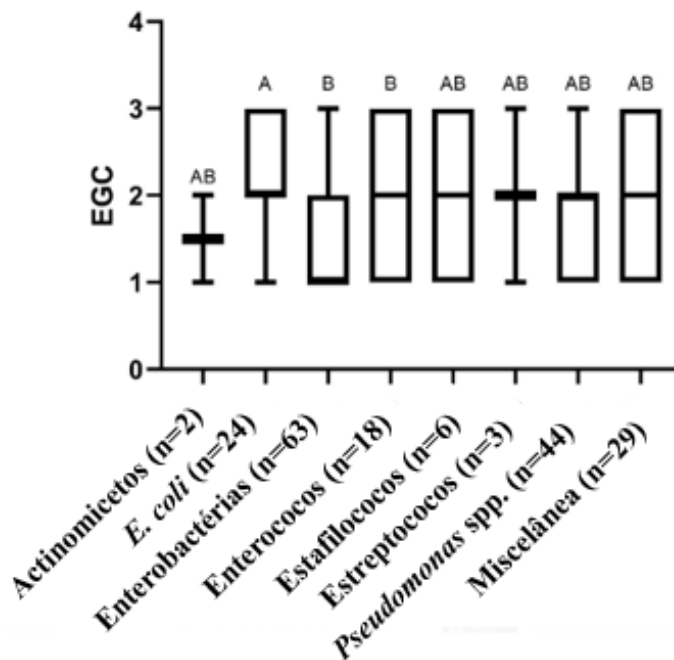
689

690

691

692

FIG.1 Boxplot dos principais grupos de micro-organismos¹ identificados por espectrometria de massas em cordeiros com infecção umbilical segundo os escores de gravidade clínica (2022-2023). EGC: Escore de Gravidade Clínica.



693

694

695

696

697

698

699

700

701

702

703

704

705

706

707

708

709

710

711

712

713

714

715

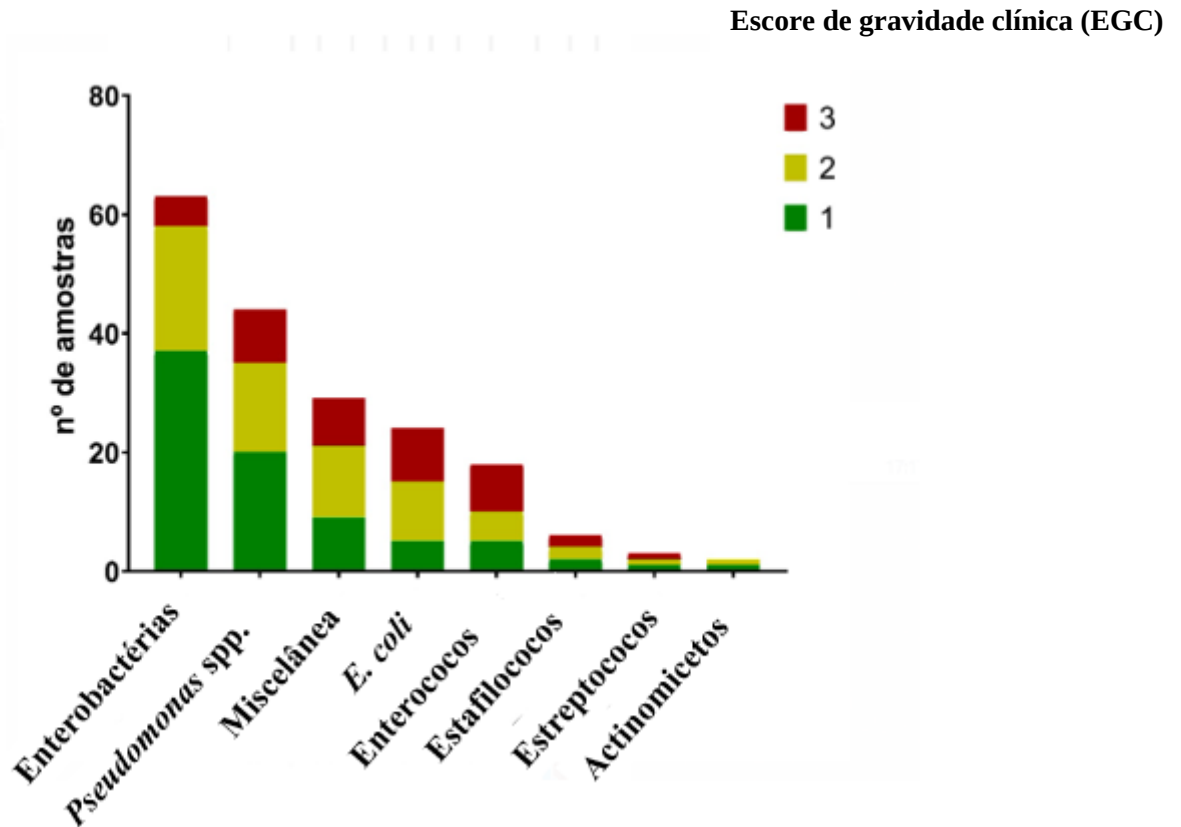
716

717

¹Micro-organismos: Actinomicetos= *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2). *Escherichia coli* (n=24). Enterobactérias= *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis* (n=3); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter turicensis* (n=1). Enterococos= *Enterococcus casseliflavus* (n=3); *Enterococcus faecalis* (n=4); *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2). Estafilococos= *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosus* (n=1). Estreptococos= *S. dysgalactiae* (n=2); *S. salivarius* (n=1). *Pseudomonas* spp.= *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3); *Pseudomonas extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae* (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1). Miscelânea= *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas hydrophila* (n=6); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida krusei* (n=4); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1).

718

719 **FIG. 2:** Frequência dos escores de gravidade clínica em infecções umbilicais em cordeiros, segundo
720 diferentes grupos de micro-organismos identificados por espectrometria de massas (2022-2023).



721

722 ¹Micro-organismos: Enterobactéria: *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter*
723 *cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis*
724 (n=3); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes*
725 (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia*
726 *adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus*
727 *mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella*
728 *aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter*
729 *turicensis* (n=1). *Pseudomonas* spp.: *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1);
730 *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3);
731 *Pseudomonas extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1);
732 *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas*
733 *mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae*
734 (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas*
735 *trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1). Miscelânea: *Achromobacter mucicolens* (n=1);
736 *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas*
737 *hydrophila* (n=6); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1);
738 *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp.
739 (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida krusei* (n=4); *Exiguobacterium mexicanum*
740 (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1).
741 *Escherichia coli* (n=24). Enterococos: *Enterococcus casseliflavus* (n=3); *Enterococcus faecalis* (n=4);
742 *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae*
743 (n=2). Estafilococos: *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosus* (n=1). Estreptococos: *S. dysgalactiae*
744 (n=2); *S. salivarius* (n=1). Actinomiceto: *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2).

Table Titles

TABELA 1. Frequência de micro-organismos isolados em cultura pura de infecções umbilicais em 128 cordeiros, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Isolado	N	%
<i>Escherichia coli</i>	24	11,21
<i>Serratia marcescens</i>	8	3,74
<i>Enterococcus faecium</i>	7	3,27
<i>Raoultella terrigena</i>	7	3,27
<i>Aeromonas hydrophila</i>	6	2,80
<i>Pseudomonas koreensis</i>	6	2,80
<i>Enterobacter kobei</i>	6	2,80
<i>Hafnia alvei</i>	5	2,34
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	2,34
<i>Pseudomonas sp.</i>	5	2,34
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1,87
<i>Providencia rettgeri</i>	4	1,87
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	4	1,87
<i>Staphylococcus sciuri</i>	4	1,87
<i>Candida krusei</i>	3	1,40
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	3	1,40
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas corrugata</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas mendocina</i>	3	1,40
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	3	1,40
<i>Rahnella aquatilis</i>	3	1,40
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	0,93
<i>Enterobacter asburiae</i>	2	0,93
<i>Massilia oculi</i>	2	0,93
<i>Pantoea sp.</i>	2	0,93
<i>Proteus mirabilis</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	2	0,93
<i>Pseudomonas jessenii</i>	2	0,93
Outros ²	52	24,30
Não identificados	27	12,62
Total Geral:	214	100

¹MALDI-TOF (MS): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de isolados; %: porcentagem.

²Outros: *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus cereus* (n=1); *Bacillus sp.* (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Candida catenulata* (n=1); *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2); *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Oceanobacillus profundus* (n=1); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1); *Salmonella sp* (n=1); *Siccibacter turicensis* (n=1); *Staphylococcus equorum* (n=1); *Staphylococcus xylosus* (n=1); *Streptococcus dysgalactiae* (n=2); *Streptococcus salivarius* (n=1); *Wickerhamomyces anomalus* (n=1).

TABELA 2. Frequência de micro-organismos isolados em associação de infecções umbilicais em cordeiros identificadas por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Micro-organismos Associados	N	%
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Escherichia coli</i>	4	6
<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Candida krusei</i>	2	3
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	2	3
<i>Escherichia coli</i> + não identificado	2	3
<i>Aeromonas hydrophila</i> + não identificado	2	3
<i>Acinetobacter lwoffii</i> + não identificado	1	1,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Acinetobacter radioresistens</i> + não identificado	1	1,5
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Candida catenulata</i>	1	1,5
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Kluyvera ascorbata</i>	1	1,5
<i>Arthrobacter gandavensis</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	1,5
<i>Enterobacter kobei</i> + <i>Leclercia adecarboxylata</i> + <i>Pseudomonas corrugata</i>	1	1,5
<i>Enterobacter kobei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Enterococcus casseliflavus</i> + não identificado	1	1,5
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,5
<i>Escherichia coli</i> + <i>Pseudomonas flavescens</i>	1	1,5
<i>Escherichia hermannii</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Hafnia alvei</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i> + <i>Enterobacter xiangfangensis</i>	1	1,5
<i>Hafnia alvei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Klebsiella aerogenes</i> + <i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	1,5
<i>Massilia oculi</i> + <i>Serratia marcescens</i> + não identificado	1	1,5
<i>Massilia oculi</i> + <i>Staphylococcus sciuri</i> + <i>Candida krusei</i> + não identificado	1	1,5
<i>Pantoea</i> sp. + <i>Klebsiella oxytoca</i> + <i>Serratia marcescens</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas brassicacearum</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas corrugata</i> + <i>Enterobacter kobei</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas gessardii</i> + não identificado	1	1,5
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas mendocina</i> + <i>Pseudomonas jessenii</i>	1	1,5
<i>Pseudomonas trivialis</i> + <i>Pseudomonas synxantha</i>	1	1,5
<i>Rahnella aquatilis</i> + <i>Pseudomonas azotoformans</i>	1	1,5
<i>Rahnella aquatilis</i> + <i>Pseudomonas rhodesiae</i> + <i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1	1,5
Outros ²	29	43
Total Geral	67	100

¹MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações; %= porcentagem.

²Outros: *Rahnella aquatilis* + *Pseudomonas extremorientalis* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Hafnia alvei* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Pseudomonas koreensis* + *Escherichia coli* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Pseudomonas extremorientalis* + não identificado (n=1); *Serratia marcescens* + não identificado (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Enterococcus faecium* + *Achromobacter mucicolens* + *Wickerhamomyces anomalus* (n=1); *Streptococcus dysgalactiae* + não identificado (n=1); *Streptococcus salivarius* + *Pseudomonas putida* (n=1); *Enterococcus casseliflavus* + *Enterobacter kobei* + *Pseudomonas chlororaphis* (n=1); *Citrobacter koseri* + *Escherichia coli* (n=1); *Proteus hauseri* + *Serratia marcescens* (n=1); *Proteus mirabilis* + *Serratia marcescens* (n=1); *Escherichia coli* + *Siccibacter turicensis* (n=1); *Lelliottia amnigena* + *Pseudomonas* sp. (n=1); *Raoultella terrigena* + *Proteus vulgaris* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Enterobacter xiangfangensis* + *Pseudomonas rhodesiae* (n=1); *Raoultella terrigena* + *Providencia rettgeri* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus penneri* (n=1); *Escherichia coli* + *Streptococcus dysgalactiae* (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Bordetella petrii* + *Cellulosimicrobium cellulans* (n=1); *Enterococcus hirae* + *Pseudomonas putida* + não identificado (n=1); *Escherichia coli* + *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Cellulosimicrobium cellulans* + não identificado (n=1); *Arthrobacter koreensis* + não identificado (n=1); *Staphylococcus sciuri* + *Enterobacter cloacae* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus vulgaris* + *Aeromonas hydrophila* (n=1); *Enterococcus gilvus* + *Exiguobacterium mexicanum* + *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Aeromonas jandaei* + não identificado (n=1); *Staphylococcus xylosus* + não identificado (n=1).

TABELA 3. Frequência de micro-organismos isolados em cultura pura de 41 cordeiros sem sinais clínicos de infecção umbilical, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Isolado	N	%
<i>Desemzia incerta</i>	14	12,1
<i>Pantoea</i> sp.	8	6,9
<i>Pantoea agglomerans</i>	5	4,3
<i>Pseudomonas koreensis</i>	4	3,4
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4	3,4
<i>Serratia fonticola</i>	4	3,4
<i>Staphylococcus succinus</i>	4	3,4
<i>Escherichia coli</i>	3	2,6
<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	3	2,6
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	3	2,6
<i>Pseudomonas flavescens</i>	3	2,6
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	1,7
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	1,7
<i>Enterobacter kobei</i>	2	1,7
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	2	1,7
<i>Proteus penneri</i>	2	1,7
<i>Providencia rettgeri</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas fulva</i>	2	1,7
<i>Pseudomonas</i> sp.	2	1,7
<i>Serratia marcescens</i>	2	1,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	1,7
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2	1,7
Outros ²	25	21,6
Não identificado	12	10,3
Total Geral:	116	100

¹MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações; %= porcentagem.²*Aerococcus viridans* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus megaterium* (n=1); *Citrobacter braakii* (n=1); *Curtobacterium* sp. (n=1); *Enterococcus faecium* (n=1); *Exiguobacterium* sp. (n=1); *Kerstersia gyiorum* (n=1); *Klebsiella pneumoniae* (n=1); *Klebsiella variicola* (n=1); *Lactococcus garvieae* (n=1); *Paenibacillus provencensis* (n=1); *Pantoea ananatis* (n=1); *Planococcus glaciei* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=1); *Pseudomonas corrugata* (n=1); *Pseudomonas fluorescens* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=1); *Pseudomonas protegens* (n=1); *Pseudomonas straminea* (n=1); *Pseudomonas vancouverensis* (n=1); *Serratia liquefaciens* (n=1); *Serratia nematodiphila* (n=1); *Solibacillus silvestres* (n=1).

TABELA 4. Frequência de micro-organismos isolados em associação do umbigo de 41 cordeiros sem sinais clínicos de infecção, diagnosticados por espectrometria de massas¹ (2022-2023).

Micro-organismos associados	N	%
<i>Exiguobacterium</i> sp + <i>Pseudomonas chlororaphis</i> + <i>Pseudomonas protegens</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	1	2,8
<i>Pantoea agglomerans</i> + <i>Pseudomonas koreensis</i>	1	2,8
<i>Staphylococcus aureus</i> + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i> + <i>Enterobacter kobei</i>	1	2,8
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pseudomonas stutzeri</i> + <i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Staphylococcus xylosus</i> + <i>Escherichia coli</i>	1	2,8
<i>Exiguobacterium mexicanum</i> + <i>Planococcus glaciei</i> + <i>Staphylococcus succinus</i>	1	2,8
<i>Pantoea agglomerans</i> + não identificado	1	2,8
<i>Serratia fonticola</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas azotoformans</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Curtobacterium</i> sp. + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Desemzia incerta</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea agglomerans</i> + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas straminea</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea</i> sp. + não identificado	1	2,8
<i>Pseudomonas flavescens</i> + <i>Pseudomonas</i> sp. + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Arthrobacter koreensis</i>	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Pantoea</i> sp.	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Serratia marcescens</i> + <i>Pantoea</i> sp.	1	2,8
<i>Serratia marcescens</i> + <i>Pantoea</i> sp. + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Pantoea</i> sp. + <i>Enterobacter kobei</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Pseudomonas azotoformans</i> + <i>Desemzia incerta</i> + <i>Paenibacillus provencensis</i> + não identificado	1	2,8
<i>Desemzia incerta</i> + <i>Acinetobacter lwoffii</i> + <i>Arthrobacter gandavensis</i> + <i>Solibacillus silvestres</i> + não identificado	1	2,8
<i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Lactococcus garvieae</i> + <i>Pseudomonas fulva</i> + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
<i>Staphylococcus xylosus</i> + <i>Enterococcus faecium</i> + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
<i>Bacillus megaterium</i> + <i>Desemzia incerta</i> + não identificado	1	2,8
<i>Aerococcus viridans</i> + <i>Staphylococcus succinus</i> + <i>Pseudomonas</i> sp.	1	2,8
<i>Serratia liquefaciens</i> + <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1	2,8
<i>Aeromonas hydrophila</i> + <i>Pseudomonas corrugata</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas koreensis</i> + <i>Serratia fonticola</i>	1	2,8
<i>Pseudomonas vancouverensis</i> + <i>Serratia fonticola</i>	1	2,8
<i>Pantoea ananatis</i> + <i>Pantoea agglomerans</i>	1	2,8
<i>Pantoea</i> sp. + <i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	1	2,8
Outros ²	6	16
Total Geral:	36	100

¹MALDI-TOF MS: Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry; N= número de associações; %= porcentagem. ²*Proteus penneri* + *Serratia fonticola* + *Providencia rettgeri* (n=1); *Serratia nematodiphila* + *Providencia rettgeri* + *Pseudomonas jessenii* (n=1); *Desemzia incerta* + *Pseudomonas fluorescens* + *Aeromonas hydrophila* (n=1); *Escherichia coli* + *Klebsiella variicola* + *Pseudomonas koreensis* (n=1); *Escherichia coli* + *Proteus penneri* + *Klebsiella pneumoniae* + *Citrobacter braakii* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* + *Proteus vulgaris* (n=1).

806

807

TABELA 5. Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, pelo método de difusão de discos, para os principais grupos de bactérias isoladas de 128 cordeiros com sinais de infecção umbilical (2022-2023).

Grupos	Antimicrobianos	Enterobactérias (n=87)			Pseudomonas sp. (n=44)			Enterococos (n=17)			Estafilococos (n=6)			Estreptococos (n=3)			Miscelânea (n=25)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos	Gentamicina	67	12	8	39	2	3	-	-	-	5	0	1	-	-	-	18	1	6
		77%	14%	9%	89%	4%	7%	-	-	-	83%	0%	17%	-	-	-	72%	4%	24%
Anfenicóis	Florfenicol	27	19	41	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	0	19	5	1
		31%	22%	47%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33%	67%	0%	76%	20%	4%
Fluorquinolonas	Enrofloxacino	34	44	9	24	18	2	3	1	13	1	4	1	0	1	2	10	8	7
		39%	50%	11%	54%	42%	4%	18%	6%	76%	17%	66%	17%	0%	33%	67%	40%	32%	28%
	Marbofloxacino	77	1	9	-	-	-	3	3	11	6	0	0	1	1	1	19	2	4
		88%	1%	11%	-	-	-	18%	18%	64%	100%	0%	0%	33%	34%	33%	76%	8%	16%
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ácido clavulânico	43	1	43	-	-	-	13	0	4	4	0	2	3	0	0	19	0	6
		49,5%	1%	49,5%	-	-	-	76%	0%	24%	66%	0%	34%	100%	0%	0%	76%	0%	24%
	Ampicilina	19	2	66	-	-	-	9	0	8	3	0	3	2	0	1	12	3	10
		23%	2%	75%	-	-	-	53%	0%	47%	50%	0%	50%	67%	0%	33 %	48%	12%	40%
	Ceftiofur	29	42	16	-	-	-	-	-	-	5	0	1	3	0	0	11	5	9
		33%	48%	19%	-	-	-	-	-	-	83%	0%	17%	100%	0%	0%	44%	20%	36%
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	56	3	28	-	-	-	9	1	7	4	0	2	1	2	0	18	0	7
		64%	3%	33%	-	-	-	53%	6%	41%	66%	0%	34%	33%	67%	0%	72%	0%	28%
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/trimetoprim	66	5	16	20	11	13	-	-	-	4	0	2	1	0	2	19	3	3
		76%	5%	19%	45%	25%	30%	-	-	-	66%	0%	34%	33%	0%	67%	76%	12%	12%

808

S=Sensível, I= intermediário, R= resistente.

809

810

811

812

813

814

815

816

817

818

819

820

821

Enterobactérias= *Citrobacter koseri* (n=1); *Enterobacter asburiae* (n=2); *Enterobacter cancerogenus* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1); *Enterobacter kobei* (n=6); *Enterobacter xiangfangensis* (n=3); *Escherichia coli* (n=24); *Escherichia hermannii* (n=1); *Escherichia vulneris* (n=1); *Hafnia alvei* (n=5); *Klebsiella aerogenes* (n=1); *Klebsiella oxytoca* (n=5); *Kluyvera ascorbata* (n=1); *Kluyvera cryocescens* (n=1); *Leclercia adecarboxylata* (n=1); *Lelliottia amnigena* (n=1); *Pantoea* sp. (n=2); *Proteus hauseri* (n=1); *Proteus mirabilis* (n=2); *Proteus penneri* (n=1); *Proteus vulgaris* (n=2); *Providencia rettgeri* (n=4); *Rahnella aquatilis* (n=3); *Raoultella terrigena* (n=7); *Salmonella* sp. (n=1); *Serratia marcescens* (n=8); *Siccibacter turicensis* (n=1). *Pseudomonas* spp.= *Pseudomonas aeruginosa* (n=1); *Pseudomonas azotoformans* (n=1); *Pseudomonas brassicacearum* (n=1); *Pseudomonas chlororaphis* (n=2); *Pseudomonas corrugata* (n=3); *Pseudomonas extremorientalis* (n=3); *Pseudomonas flavescens* (n=1); *Pseudomonas gessardii* (n=1); *Pseudomonas graminis* (n=1); *Pseudomonas jessenii* (n=2); *Pseudomonas koreensis* (n=6); *Pseudomonas mendocina* (n=3); *Pseudomonas oleovorans* (n=2); *Pseudomonas putida* (n=2); *Pseudomonas rhodesiae* (n=4); *Pseudomonas* sp. (n=5); *Pseudomonas stutzeri* (n=3); *Pseudomonas synxantha* (n=1); *Pseudomonas trivialis* (n=1); *Pseudomonas umsongensis* (n=1). Enterococos= *Enterococcus casseliflavus* (n=2); *Enterococcus faecalis* (n=4); *Enterococcus faecium* (n=7); *Enterococcus gallinarum* (n=1); *Enterococcus gilvus* (n=1); *Enterococcus hirae* (n=2). Estafilococos= *S. equorum* (n=1); *S. sciuri* (n=4); *S. xylosus* (n=1). Estreptococos= *S. dysgalactiae* (n=2); *S. salivarius* (n=1). Miscelânea= *Achromobacter mucicolens* (n=1); *Acinetobacter lwoffii* (n=2); *Acinetobacter radioresistens* (n=1); *Aerococcus viridans* (n=1); *Aeromonas hydrophila* (n=6); *Aeromonas jandaei* (n=1); *Aeromonas veronii* (n=1); *Arthrobacter arilaitensis* (n=1); *Arthrobacter gandavensis* (n=1); *Arthrobacter globiformis* (n=1); *Arthrobacter koreensis* (n=1); *Bacillus* sp. (n=1); *Bordetella petrii* (n=1); *Cellulosimicrobium cellulans* (n=2); *Exiguobacterium mexicanum* (n=1); *Massilia oculi* (n=2); *Oceanobacillus profundus* (n=1).

822 TABELA 6. Perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, pelo método de difusão de discos, para os principais grupos de bactérias isoladas do cordão
823 umbilical de cordeiros sem sinais de onfalite (2022-2023).

824

Grupos	Antimicrobianos	<i>Pseudomonas</i> sp. (n=26)			Estafilococos (n=8)			Enterobactérias (n=32)			Miscelânea (n=35)		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosídeos	Gentamicina	26	0	0	8	0	0	31	1	0	27	6	2
		100%	0%	0%	100%	0%	0%	97%	3%	0%	77%	17%	6%
Anfenicóis	Florfenicol	-	-	-	-	-	-	30	2	0	32	1	2
		-	-	-	-	-	-	94%	6%	0%	91%	3%	6%
Fluorquinolonas	Enrofloxacino	16	5	5	4	2	2	24	8	0	8	9	18
		62%	19%	19%	50%	25%	25%	75%	25%	0%	23%	26%	51%
	Marbofloxacino	-	-	-	8	0	0	30	2	0	20	9	6
		-	-	-	100%	0%	0%	94%	6%	0%	57%	26%	17%
Penicilinas e derivados betalactâmicos	Amoxicilina/ácido clavulânico	-	-	-	8	0	0	18	4	10	32	0	3
		-	-	-	100%	0%	0%	56%	12,5%	31,5%	91%	0%	9%
	Ampicilina	-	-	-	6	2	0	15	6	11	32	0	3
		-	-	-	75%	25%	0%	47%	19%	34%	91%	0%	9%
	Ceftiofur	-	-	-	6	2	0	23	8	1	16	8	11
		-	-	-	75%	25%	0%	72%	25%	3%	46%	23%	31%
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	-	-	-	6	1	1	26	0	6	33	1	1
		-	-	-	75%	12,5%	12,5%	81%	0%	19%	94%	3%	3%
Sulfonamidas	Sulfametoxazole/trimetoprim	11	2	13	5	0	3	27	2	3	16	6	13
		42%	8%	50%	62,5%	0%	37,5%	85%	6%	9%	46%	17%	37%

825 S=Sensível, I= intermediário, R= resistente.

826 *Pseudomonas* spp= *Pseudomonas azotoformans* (n=2), *Pseudomonas chlororaphis* (n=3), *Pseudomonas corrugata* (n=1), *Pseudomonas flavescens* (n=3), *Pseudomonas fluorescens* (n=1), *Pseudomonas fulva* (n=2), *Pseudomonas jessenii* (n=1),
827 *Pseudomonas koreensis* (n=4), *Pseudomonas protegens* (n=1), *Pseudomonas* sp. (n=2), *Pseudomonas straminea* (n=1), *Pseudomonas stutzeri* (n=4), *Pseudomonas vancouverensis* (n=1). Estafilococos= *Staphylococcus aureus* (n=2),
828 *Staphylococcus succinus* (n=4), *Staphylococcus xylosus* (n=2). Enterobactérias= *Enterobacter kobei* (n=1), *Escherichia coli* (n=1), *Pantoea agglomerans* (n=1), *Serratia fonticola* (n=1). Miscelânea= *Acinetobacter hwoffii* (n=2), *Aerococcus*
829 *viridans* (n=1), *Aeromonas hydrophila* (n=2), *Arthrobacter gandavensis* (n=1), *Arthrobacter koreensis* (n=1), *Bacillus megaterium* (n=1), *Curtobacterium* sp. (n=), *Desemzia incerta* (n=14), *Enterococcus faecium* (n=1), *Exiguobacterium*
830 *mexicanum* (n=2), *Exiguobacterium* sp. (n=1), *Kerstersia gyiorum* (n=1), *Lactococcus garvieae* (n=1), *Nocardiopsis dassonvillei* (n=3), *Paenibacillus provencensis* (n=1), *Planococcus glaciei* (n=1), *Solibacillus silvestres* (n=1).