

Ação de antibióticos e quimioterápicos sobre alguns agentes bacterianos da mastite bovina, isolados da água utilizada no processo de obtenção do leite

(Action of antibiotics and chemotherapics on some bacterial agents of bovine mastitis isolated from water utilized in the milking process)

L.A. Amaral¹, A. Nader Filho¹, O.D. Rossi Júnior¹, L.H.C. Penha²

¹Depto. de Medicina Veterinária Preventiva
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
"Campus" de Jaboticabal (FCAVJ, UNESP)
14870-000 Jaboticabal, SP

²Acadêmica do Curso de Graduação em Medicina Veterinária - FCAVJ, UNESP

RESUMO

Três cepas de *Staphylococcus aureus*, 73 de *Staphylococcus* coagulase negativa e 28 de *Escherichia coli*, isoladas a partir das amostras de água oriundas de 10 propriedades leiteiras, foram submetidas ao teste de sensibilidade "in vitro" frente a alguns antibióticos e quimioterápicos. Os resultados evidenciaram que todas as cepas isoladas apresentaram resistência a pelo menos um dos princípios ativos testados. As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa e de *Escherichia coli* apresentaram resistência a três ou mais princípios ativos em 100,00%, 84,93% e 71,43% dos casos, respectivamente. Tais achados são preocupantes, principalmente se considerado o importante papel que a água empregada no processo de obtenção do leite pode representar na veiculação dos referidos agentes etiológicos da mastite bovina.

Palavras-chave: Água, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa, *Escherichia coli*, mastite bovina

ABSTRACT

Three strains of *Staphylococcus aureus*, 73 coagulase negative *Staphylococcus* and 28 *Escherichia coli* strains, isolated from water samples from 10 dairy farms, were tested for "in vitro" sensitivity to antibiotics and chemotherapeutics. The results showed that all samples isolated presented resistance to at least one active drug tested. The percentage of *S. aureus*, coagulase negative *Staphylococcus* and *E. coli* strains that exhibited resistance to the three active drugs were 100.00%, 84.93% and 71.43%, respectively. These results are important mainly due to the role of water as a vehicle for transmission of mastitis bacterial agents during the milking process.

Key words: Water, *Staphylococcus aureus*, coagulase negative *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, bovine mastitis

INTRODUÇÃO

Vários são os fatores que podem contribuir para a contaminação das águas subterrâneas, dentre os quais destaca-se a ubiquidade de determinados microrganismos, especialmente daqueles pertencentes ao grupo dos coliformes e aos dos gêneros *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (Robinson, 1987; Filip et al., 1988; Schukken et al., 1991).

No processo de obtenção do leite, inúmeras são as propriedades rurais que utilizam a água oriunda de lençóis subterrâneos, desprovida de qualquer forma de tratamento. Esta pode constituir-se em importante fonte de contaminação bacteriana para o úbere, equipamentos, utensílios e conseqüentemente, para o próprio leite (Galton et al., 1982). Alguns autores concordam que além do comprometimento da qualidade do leite, o emprego de água contaminada pode, também, aumentar o risco de casos de mastite no rebanho (Robinson, 1987; Filip et al., 1988; Schukken et al., 1991).

A mastite bovina constitui-se numa das enfermidades mais importantes do rebanho leiteiro, capaz de determinar consideráveis perdas econômicas pela redução da quantidade e pelo comprometimento da qualidade do leite produzido, ou até pela perda total da capacidade secretora (Leite et al., 1976; Nicolau et al., 1992). Vários são os agentes etiológicos causadores desta enfermidade, tendo sido relacionados na literatura 137 espécies de microrganismos pertencentes a cerca de 35 gêneros (Watts, 1988). Todavia, a investigação da etiologia da

mastite bovina no país tem destacado a elevada importância das bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* e *Escherichia coli* (Ferreiro, 1981; Nader Filho et al., 1985; Fagliari et al., 1990; Nicolau et al., 1992).

Tendo em vista o exposto e considerando a ausência de informações sobre o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos causadores da mastite bovina que podem ser veiculados pela água utilizada nas propriedades rurais, idealizou-se o presente trabalho com o objetivo de conhecer a eficiência de alguns antibióticos e quimioterápicos frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, de *Staphylococcus* coagulase negativa e de *Escherichia coli*, isoladas em amostras de água não tratada, empregada no processo de obtenção do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 10 propriedades rurais produtoras de leite dos tipos A, B e C, localizadas na região de Jaboticabal, Estado de São Paulo, nas quais adotava-se o sistema de ordenha mecânica, realizada duas vezes ao dia.

As fontes de abastecimento de água disponíveis nas propriedades eram constituídas por cinco poços artesianos ou semi-artesianos, três minas, um poço raso e um córrego. A captação da água era realizada por bombas de sucção, armazenada em reservatórios aéreos e distribuída por canalização subterrânea até os diferentes pontos de utilização.

No período de setembro de 1993 a junho de 1994, colheu-se, mensalmente, uma amostra da água utilizada na higienização dos animais, utensílios e equipamentos em cada propriedade rural, de acordo com a técnica recomendada pela American Public Health Association (Standard... 1985).

As amostras foram obtidas diretamente das mangueiras de água sob pressão existentes na sala de ordenha e, após o acondicionamento em caixas de material isotérmico ("isopor"), contendo cubos de gelo, eram imediatamente transportadas para os laboratórios do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus de Jaboticabal"/UNESP, onde se realizavam o isolamento e a identificação do *Staphylococcus aureus*, do *Staphylococcus* coagulase negativa e da *Escherichia coli*, e seus respectivos antibiogramas.

Para isolamento e identificação do *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus coagulase negativa* foram filtrados 100ml da amostra de água em aparelho contendo membrana com porosidade de 0,45µm. Em seguida, as membranas foram transferidas para superfície de placas de Petri contendo ágar *Staphylococcus* 110 e incubadas a 35°C por 48 horas. Decorrido este tempo, as colônias isoladas foram semeadas em ágar nutriente inclinado e incubadas a 35°C por 24 horas (Lechevallier & Seidler, 1977).

Após a incubação, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, sendo as cepas que apresentavam cocos Gram + dispostas sob a forma de cachos de uva submetidas à identificação bioquímica através das provas de coagulase, termonuclease, catalase, acetoina, maltose, trealose, manitol e da oxidação e fermentação da glicose (Mac Faddin, 1976).

Para isolamento e identificação da *Escherichia coli*, utilizou-se a metodologia recomendada pelo American Public Health Association (Standard... 1985).

Para a realização dos antibiogramas, três a cinco colônias de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase negativa* e *Escherichia coli* eram inoculadas em caldo soja triptose e incubadas a 35°C por duas a cinco horas, até a obtenção de turvação idêntica à solução padrão de cloreto de bário preconizada por Bauer et al. (1966). Após a incubação, as culturas padronizadas eram semeadas em placas de Petri contendo Ágar Muller-Hinton, em cuja superfície colocavam-se os discos impregnados com os princípios ativos a serem testados. Decorridos 24 horas de incubação a 35°C, procedia-se a medição dos halos de inibição formados em torno dos respectivos princípios ativos, cujos resultados eram comparados com os da tabela fornecida pelo laboratório fabricante dos referidos discos.

RESULTADOS

A Tab. 1 mostra a resistência "in vitro" do *Staphylococcus coagulase negativa*, *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus*, isolados das amostras de água utilizada no processo de obtenção do leite, distribuídos de acordo com os vários antibióticos e quimioterápicos testados. Observa-se que ampicilina, carbenicilina e tetraciclina foram os princípios ativos aos quais as cepas de *Escherichia coli* apresentaram maior resistência. Verifica-se, também, que oxacilina, ampicilina e penicilina foram os princípios ativos aos quais o *Staphylococcus coagulase negativa* e o *Staphylococcus aureus* apresentaram maior resistência.

Os dados constantes da Tab. 2 mostram a distribuição dos *Staphylococcus* coagulase negativa, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, de acordo com o número mínimo de antibióticos e quimioterápicos aos quais apresentaram resistência “in vitro”. Observa-se que todos os microrganismos isolados das amostras apresentaram resistência a pelo menos um dos princípios ativos testados.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os valores inseridos nas Tab. 1 e 2 revelam que os *Staphylococcus* coagulase negativa, a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus* isolados das amostras apresentaram múltipla resistência “in vitro” frente aos antibióticos e quimioterápicos testados.

Tabela 1. Resistência “in vitro” do *Staphylococcus* coagulase negativa, da *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus*, isolados das amostras de água utilizada no processo de obtenção do leite

Antibióticos e quimioterápicos	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Oxalina	65	89,04	nt	nt	3	100,00
Ampicilina	65	89,04	26	92,96	2	66,67
Penicilina	63	86,36	nt	nt	2	66,67
Carbenicilina	nt	nt	21	75,00	nt	nt
Lincomicina	39	53,42	nt	nt	1	33,33
Tetraciclina	19	26,03	20	71,43	1	33,33
Eritromicina	14	19,18	nt	nt	-	-
Cefalotina	9	12,33	11	39,29	nt	nt
Polimixina	nt	nt	10	35,71	-	-
Amicacina	9	12,33	8	28,57	nt	nt
Cefoxitina	nt	nt	4	14,29	nt	nt
Nitrofurantoina	nt	nt	4	14,29	1	33,33
Vancomicina	9	12,33	nt	nt	-	-
Cloranfenicol	9	12,33	1	3,57	-	-
Gentamicina	3	4,11	2	7,14	-	-
Sulfazotrim	3	4,11	2	7,14	-	-
Tobramicina	nt	nt	-	-	nt	nt

nt - não testado

A inexistência de informações a este respeito impossibilita a confrontação destes achados com os de outros autores. Todavia, deve-se destacar que alguns trabalhos têm sido realizados com o intuito de verificar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das bactérias patogênicas isoladas de amostras de água superficiais e subterrâneas (Baldini & Cabelazi, 1988; Ghazali et al., 1988; Sokari et al., 1988; Perez et al., 1993).

Tabela 2. Distribuição do *Staphylococcus* coagulase negativa da *Escherichia coli* e do *Staphylococcus aureus*, de acordo com o número mínimo de antibióticos e quimioterápicos aos quais apresentaram resistência "in vitro"

Número mínimo de antibióticos e quimioterápicos	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Um	73	100,00	28	100,00	3	100,00
Dois	71	97,26	26	92,86	3	100,00
Três	62	84,93	20	71,43	3	100,00
Quatro	38	52,06	15	53,57	2	66,67
Cinco	33	45,20	11	39,29	2	66,67
Seis	29	39,73	5	17,86	1	33,33

Apesar das referidas investigações terem objetivos totalmente diferentes dos almejados no presente trabalho, pode-se constatar a concordância dos resultados com relação à múltipla resistência "in vitro" das bactérias isoladas. Tais achados têm sido atribuídos ao uso extensivo de antibióticos em medicina e na agropecuária (Van Rensburg et al., 1975), às limitações do valor antimicrobiano das drogas (Hinshaw et al., 1969) e a transferência de fatores de resistência (Mitsuhashi, 1977 apud Armstrong, 1981).

Acredita-se que os achados deste trabalho sejam preocupantes, principalmente se considerado o importante papel que a água pode representar na veiculação dos referidos agentes etiológicos da mastite bovina e que tais achados evidenciam a necessidade da adoção de medidas de desinfecção da água empregada no processo de obtenção do leite, uma vez que a grande maioria das propriedades leiteiras é desprovida de qualquer forma de tratamento. Tal procedimento, certamente, seria de grande valor para complementação das medidas preventivas preconizadas para o controle da mastite bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, J.L., SHIGENO, D.S., CALOMIRIS, J.J. et al. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* v.42, p.277-283, 1981.
- BALDINI, M.D., CABEZALI, C.D. Distribución de *Escherichia coli* en aguas del estuario de Bahía Blanca - Argentina. *Rev. Latinam. Microbiol.*, v.30, p.229-234, 1988.
- BAUER, A.W., KIRK, M.M., SHERRIS, J.C. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, v.45, p.493-496, 1966.
- FAGLIARI, J.J., LUCAS, A., FERREIRA NETO, J.M. Mastite bovina: comparação entre os resultados obtidos no California Mastitis Test e o exame bacteriológico. *Cien. Vet.*, v.4, p.5, 1990.
- FERREIRO, L. Agentes etiológicos da mastite bovina no Brasil. *Arq. Esc. Vet., UFRGS*, v.6, p.77-88, 1981.
- FILIP, A., KADDU-MALINDWAB, D., MILD, G. Survival and adhesion of the some pathogenic and facultative pathogenic microorganisms in groundwater. *Water Sci. Technol.*, V.19, P.1189, 1988.
- GALTON, D.M., ADKINSON, R.W., THOMAS, C.V. et al. Effects of premilking udder preparation on environmental bacterial contamination of milk. *J. Dairy Sci.*, v.65, p.1540-1543, 1982.
- GHAZALI, M.R., JAZRAWI, S.F., AL-DOORI, Z.A. Antibiotic resistance among pollution indicator bacteria isolated from Al-Khair river, Baghdad. *Water Res.* v.22, p.641-644, 1988.
- HINSHAW, V., PUNCH, J., ALLISON, M.J. Frequency of R-factor-mediated multiple drug resistance in *Klebsiella* and *Aerobacter*. *Appl. Envir. Microbiol.*, v.17, p.214-218, 1969.
- LECHEVALIER, M.W., SEIDLER, R.J. *Staphylococcus aureus* in rural drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.30, p.1157-1159, 1977.
- LEITE, R.C., BRITO, F.R.F., FIGUEIREDO, J.B. Alterações da glândula mamária de vacas tratadas intensivamente, via mamária, com penicilina em veículo aquoso. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, v.28, p.27-31, 1976.
- MC FADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Baltimore. Williams & Wildins. 1976.
- NADER FILHO, A., SHOCKEN-ITURRINO, R.P., ROSSI JÚNIOR, O.D. et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Ribeirão Preto, São Paulo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.5, p.53-56, 1985.

- NICOLAU, E.S., NADER FILHO, A., AMARAL, L.A. et al. Influência da mastite subclínica estafilocócica sobre a produção láctea dos quartos afetados. *Ars. Vet.*, v.8, p.118-124, 1982.
- PÉREZ, P.F., CONSTANZA, O., GARRE, M. et al. Aislamiento de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos a partir de águas del Rio de la Plata. *Rev. Arg. Microbiol.*, v.25, p.7-14, 1993.
- ROBINSON, R.K. *Microbiologia lactológica*. Zaragoza: Acribia, 1987, 230p.
- SCHUKKEN, Y.H., GROMMER, F.J., VAN DER GREER, D. et al. Risk factors for clinical mastitis in herds with low bulk milk somatic cell count. 2-Risk factors for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.826-832, 1991.
- SOKARI, T.G., IBIEBELE, D.D., OTTIH, R.M. Antibiotic resistance among coliforms and *Pseudomonas spp* from bodies of water around Prot Harcourt, Nigeria. *J. Appl. Bacteriol.*, v.64, p.355-359, 1988.
- STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 16. ed. New York: American Public Health Association. 1985.
- VAN RENSBUR, L.J., DEKOCK, M.J., VAN RENSBURG, A.J. Antibiotic resistance and R-factors in *Klebsiella pneumoniae*. *S. Afr. Med. Vet. J.*, n.49, p.1876-1878, 1975.
- WATTS, J.L. Etiological agents of mastitis. *Vet. Microbiol.*, v.16, p.41-66, 1988.