

RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE DE VACAS FRENTE A
DOZE DROGAS ANTIBACTERIANAS*

Milk Bacterial Resistance Against Twelve Antibacterial Drugs

Sidoni Riedner**, Antonio Jorge Dreon de Albuquerque***,
Manoel Renato Telles Badke**** e Rudi Weiblen*****

RESUMO

Duzentas e vinte e duas cepas bacterianas foram submetidas ao teste de resistência a doze drogas antimicrobianas. As cepas testadas foram: *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. (Gram negativos) e *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* sp. (Gram positivos). As drogas usadas, na forma de discos impregnados, foram: amicacina, ampicilina, bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, lincomicina, nitrofurantoína, penicilina G, sulfazotrina e tetraciclina. O teste foi realizado pelo método de difusão em ágar Mueller-Hinton para os bacilos Gram negativos e *Staphylococcus aureus*. Para o *Streptococcus* sp., foi adicionado 10% de sangue de equino desfibrinado. Os resultados encontrados mostram que os bacilos Gram negativos apresentam, de uma forma geral, uma alta resistência às drogas testadas, encontrando-se alguma sensibilidade à ampicilina, gentamicina e nitrofurantoína, sendo o melhor índice o da *Escherichia coli* ao sulfazotrina (5,3%). O *Staphylococcus aureus* apresentou uma resistência próximo a 100% frente à ampicilina, penicilina G e tetraciclina; Uma va-

* Extraído da Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Santa Maria, RS.

** Ex-aluna do Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. 97.119. Santa Maria, RS, Brasil.

*** Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria. 97.119. Santa Maria, RS, Brasil.

**** Professor Auxiliar do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria. 97.119. Santa Maria, RS, Brasil.

***** Professor Adjunto do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria. 97.119. Santa Maria, RS, Brasil. Pesquisador do CNPq.

riação de 10 a 30% com relação à eritromicina, nitrofurantoína, cloranfenicol, lincomicina e sulfazotrin e inferior a 8% frente a gentamicina e bacitracina. O *Streptococcus* sp., não apresentou a resistência esperada aos produtos testados, variando de 4,2% (nitrofurantoína) a 91,7% (amikacina). Estatisticamente não houve diferença significativa entre ($P > 0,001$) os tipos de microorganismos testados.

UNITERMOS: resistência bacteriana, leite, drogas antimicrobianas.

SUMMARY

Two hundred and twenty two bacterial strains were submitted to the resistance test against twelve antibacterial drugs. The strains tested were: *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. (Gram negatives); and *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus* sp.; (Gram positives). The drugs used in the form of impregnated discs were amikacin, ampicillin, bacitracin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, gentamycin, lincomycin, nitrofurantoin, penicillin G, sulfazotrin and tetracycline. The agar Mueller-Hinton diffusion test was used for *Staphylococcus aureus* and for Gram negative bacillus. For the *Streptococcus* sp. 10% defibrinated equine erythrocytes were added. The results showed that the Gram negative Bacilli had a high resistance against the drugs used, some sensitivity were found with ampicillin, gentamycin and nitrofurantoin, the best index was obtained with sulfazotrin against *Escherichia coli*, 5.3% of resistance close to 100%, when tested against erythromycin, nitrofurantoin, chloramphenicol, lincomycin and sulfazotrin varied from 10 to 30% and were lower than 8% for gentamycin and bacitracin. The *Streptococcus* sp. did not show the resistance expected for the drugs used, and varied from 4.2% when nitrofurantoin was tested to 91.7% whit amikacin. There was no significant difference among the drugs used, however, statistically difference ($P > 0,01$) between the type of bacteria was detected.

KEY WORDS: bacterial resistance, milk, antibacterial drugs.

INTRODUÇÃO

Mastite é uma reação inflamatória dos tecidos do úbere frente a bactérias, produtos químicos, lesões térmicas e mecânicas (BATH et alii, 3; GRUNERT & WEIGT, 12). Ela tem importância em saúde pública pela fácil transmissão de agentes patogênicos pelo leite ao consumidor (ARNALDE et alii, 1; VERMA et alii, 25) e pela presença de altos níveis de antibióticos (KIMBALL, 18; WEIBLEN & SPAHR, 26) que podem trazer sérios

problemas à população consumidora. Quanto ao aspecto econômico há prejuízos devido à redução da produção de leite, do incremento dos custos de reposição e conseqüente perda do potencial genético devido ao descarte da vaca, perda do leite, e outros custos, tais como: antibióticos, serviços veterinários, mão de obra incrementada e redução da qualidade do leite (JANZEN, 17; HOPKIRK, 14; DOBBINS, 7; BATH et alii, 3; ARDA & ISTANVULLUOGLU, 2; BLOSSER, 5; McDONALD, 21; WEIGT, 27). A profilaxia desta doença exige contínuas medidas higiênicas no estábulo e na ordenha, bem como, cuidados sanitários para evitar a introdução e a propagação de novas infecções.

O controle das infecções já estabelecidas não úbere requer o diagnóstico, se possível etiológico, dentro do menor prazo viável e medicação com produtos terapêuticos eficazes contra o germe causador do processo infeccioso (LANGENEGGER et alii, 20). A mastite clínica vem sendo descrita como doença em bovinos já há dois séculos, havendo a necessidade de se dar mais atenção ao controle das mastites de forma subclínica, devido à evolução da doença e implicações no aspecto econômico, visando o emprego correto de exames periódicos (TOLLE, 24).

Um assunto de grande importância está relacionado com o desenvolvimento da resistência bacteriana a drogas antibacterianas e a redução da pesquisa da mesma. A preocupação de vários pesquisadores refere-se, principalmente, ao uso indiscriminado dos antibióticos de largo espectro de forma empírica por leigos (LANGENEGGER et alii, 19; LANGENEGGER et alii, 20).

Antibiogramas, realizados em 75 amostras bacterianas por FAGLIARI et alii (8), revelaram diferentes níveis de sensibilidade aos dez medicamentos testados, com grande número de amostras manifestando pouca sensibilidade. O sulfazotrin foi a droga mais eficaz contra o *Staphylococcus aureus* e a ampicilina, a substância de melhor ação frente ao *Streptococcus* sp. Conforme FERREIRO et alii (9), tem havido uma concordância geral nos resultados da maioria dos estudos dessa natureza no Brasil; encontrando-se o *Streptococcus* sp. numa posição secundária na casuística da mastite bovina, ratificando o que se registra atualmente em outras bacias leiteiras de diversos países. Entre outras razões, essa tendência encontra respaldo na terapia, já que estes germes são muito sensíveis à ação terapêutica exercida pela penicilina, antibiótico de largo emprego na prática, principalmente, no combate à mastite. Os germes gram negativos, bem como o *Staphylococcus aureus* podem surpreender nos resultados quanto à sua resistência e sensibilidade às drogas anti-

bacterianas, principalmente se o uso destas for efetuado de forma indiscriminada sem um prévio teste, limitando-se o tratamento de mastites diagnosticadas clinicamente, por tentativas, geralmente feitas pelo proprietário (LANGENEGGER et alii, 19; HOPKIRK, 14; LANGENEGGER et alii, 20). Face aos fatores expostos, existe a necessidade de conhecer os índices de resistência da população bacteriana potencialmente patogênica aos úberes das vacas de todo rebanho de forma prévia, para que o tratamento da mastite possa ser estabelecido rapidamente e com maior margem de eficácia nos casos clínicos (LANGENEGGER et alii, 20).

A presente pesquisa tem como escopo exaltar a importância do diagnóstico precoce na prevalência da mastite subclínica, mediante o teste de resistência às drogas antibacterianas, após o isolamento de bactérias potencialmente patogênicas ao úbere com avaliações periódicas. O objetivo é a obtenção de subsídios para que os clínicos possam ter dados sobre a epidemiologia e obter melhores resultados no controle da doença no Estado do Rio Grande do Sul, mais especificamente, na região de Santa Maria, RS.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta e cinco vacas leiteiras de 2 propriedades foram objeto de observação durante 3 períodos de 7 semanas consecutivas, sendo cada etapa separada por intervalos de 10 semanas, e efetuada a coleta de 860 amostras de leite.

Os procedimentos empregados na ordenha e exame clínico da glândulas mamárias foram conforme descritas por HEIDRICH & RENK (13). No laboratório, para determinação da prevalência de bactérias potencialmente patogênicas aos tecidos do úbere, foi efetuada a pesquisa, isolamento e identificação conforme indicado por CARTER (6) e BIER (4).

O teste de sensibilidade às drogas antibacterianas foi realizado utilizando-se o método de difusão em ágar Mueller-Hinton (MERK)* para *Staphylococcus aureus* e bacilos gram negativos e para *Streptococcus* sp. adicionava-se 10% de sangue desfibrinado de equino. Após a solidificação do meio, a cepa bacteriana era espalhada uniformemente sobre a superfície do ágar, utilizando-se um "swab" estéril.

As drogas usadas na forma de discos impregnados foram: amicacina (30mcg), ampicilina (10mcg), cloranfenicol (30mcg), eritromicina (15mcg), gentamicina (10mcg), nitrofurantoína (300 UI), penicilina G (10mcg),

* MERK S.A. - Indústrias Químicas - RS, Brasil.

sulfazotrin (300 UI) e tetraciclina (30mcg) (LABORCLIN)*; bacitracina (10 UI), estreptomicina (10mcg) e lincomicina (2mcg) (CECON)**.

O delineamento experimental foi de blocos ao acaso com número variável de repetições, de um experimento fatorial 3 X 2 (3 épocas X 2 propriedades). A análise estatística inclui: análise de variância e diferenças significativas ao nível de 5% ensejaram a aplicação do teste de Duncan ao mesmo nível de probabilidade de "F", conforme STEEL & TORRIE (23).

RESULTADOS, DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Das 860 amostras de leite coletadas, 311 apresentaram resultados positivos no isolamento de bactérias patogênicas ao úbere de vacas leiteiras. Destas, 222 foram testadas frente à 12 drogas antibacterianas. Os resultados obtidos estão expressos nas Tabelas 1, 2 e 3.

Os *Staphylococcus aureus* testados foram altamente resistentes à ampicilina, penicilina G e tetraciclina, com índices de resistência próximo a 100%. A resistência à eritromicina, nitrofurantoína, cloranfenicol, lincomicina e sulfazotrin variou de 10 a 30%. A resistência à gentamicina e bacitracina foi inferior a 8%. Os *Streptococcus* sp. não mostraram a resistência esperada aos produtos testados. As cepas bacterianas gram negativas apresentaram uma alta resistência no geral. Os únicos produtos que apresentaram alguma sensibilidade foram a ampicilina, gentamicina e nitrofurantoína, sendo o melhor índice o da *Escherichia coli* ao sulfazotrin com 94,7%.

É reconhecida a resistência dos *Staphylococcus* quando em infecções crônicas. A terapia é mais eficaz nos casos agudos que nos crônicos. Em função destas observações, GIRAUDO & TAMGNINI (11) recomendaram a prevenção da implantação de mastites crônicas através da eliminação de vacas que apresentarem um ou mais quartos que não respondam aos tratamentos, evitando-se com isso infecções em quartos sadios ou passíveis de tratamento.

Verificou-se, nas 2 propriedades, o emprego de antibióticos para tratamento de animais suspeitos de portarem mastite sem prévia comprovação laboratorial. Para o combate dos casos clínicos, os proprietários usavam produtos, cuja dosagem e frequência de aplicação não correspondia ao indicado tecnicamente. Diante do uso indiscriminado de agentes

* LABORCLIN - Produtos para laboratório Ltda.-Piraquara - PR, BRASIL.

**CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda., SP, BR.

TABELA 1. Taxa de resistência de microorganismos patogênicos, isolados do leite de vacas nos diferentes estágios da lactação, durante a primavera, verão e outono, de duas granjas leiteiras de Santa Maria, RS/1983-1984.

Drogas Usadas (%)	Microorganismos isolados					
	*1	2	3	4	5	6
	Total de cepas bacterianas testadas					
	174	24	1	19	3	1
**AK	48,3	91,7	-	84,2	100,0	-
AM	96,0	45,8	-	52,6	100,0	-
BC	4,6	12,5	100,0	100,0	100,0	-
CM	13,2	8,3	100,0	100,0	-	-
ER	23,0	12,5	100,0	100,0	100,0	-
ET	54,0	75,0	100,0	100,0	100,0	-
GE	7,5	45,8	-	36,8	-	-
LN	14,4	37,5	100,0	100,0	100,0	100,0
NI	27,6	4,2	-	47,4	100,0	100,0
PE	95,4	33,3	100,0	100,0	100,0	100,0
ST	14,4	8,3	-	5,3	33,3	-
TE	86,2	75,0	100,0	84,2	100,0	100,0

* 1 - *Staphylococcus aureus*

4 - *Escherichia coli*

2 - *Streptococcus* sp.

5 - *Klebsiella* sp.

3 - *Citrobacter* sp.

6 - *Proteus* sp.

** AK - Amicacina

AM - Ampicilina

BC - Bacitracina

CM - Cloranfenicol

ER - Eritromicina

ET - Estreptomicina

GE - Gentamicina

LN - Lincomicina

NI - Nitrofurantoina

PE - Penicilina G

ST - Sulfazotrin

TE - Tetraciclina

TABELA 2. Média aritmética da resistência das cepas bacterianas testadas frente a 12 drogas antimicrobianas, obtida para análise estatística referente à Tabela 1.

Drogas Antibacterianas usadas (NS)	Média Aritmética
Amicacina	20,8
Ampicilina	31,8
Bacitracina	5,7
Cloranfenicol	7,5
Eritromicina	11,0
Estreptomicina	22,5
Gentamicina	5,2
Lincomicina	9,7
Nitrofurantoína	10,3
Penicilina G	33,0
Sufazotrin	4,8
Tetraciclina	31,5

(NS) = não significativo para drogas usadas no teste resistência aos microorganismos.

TABELA 3. Média aritmética do número de microorganismos testados, obtida para análise estatística referente à tabela 1.

Microorganismos Testados (S)	Média Aritmética
<i>Staphylococcus aureus</i>	70,3 ^a
<i>Streptococcus</i> sp.	9,0 ^{b,c}
<i>Citrobacter</i> sp.	0,6 ^d
<i>Escherichia coli</i>	14,4 ^b
<i>Klebsiella</i> sp.	2,3 ^{c,d}
<i>Proteus</i> sp.	0,3 ^d

(S) Significativo para tipos de microorganismos testados às drogas antibacterianas.

($P < 0,01$) = Médias seguidas de letras diferentes são significativamente diferentes entre si pelo teste de Duncan ao mesmo nível da probabilidade de "F".

antibacterianos nas glândulas mamárias das vacas em estudo, associado à facilidade que certas bactérias patogênicas possuem para desenvolver tolerância às drogas antibacterianas, o alto índice de resistência encontrado pelo *Staphylococcus aureus* e bactérias gram negativas testadas não é surpreendente. O grande número de bactérias com pouca sensibilidade às drogas antibacterianas encontrado nesta pesquisa e pelos diversos autores (IBRAHIM & HABIBALLA, 16; GIRAUDO & TAMAGNINI, 10; PIANTA & FALLAVENA, 22; FAGLIARI et alii, 8), reforçam a necessidade de se fazer cultura microbiológica e antibiogramas como rotina para a identificação do agente e seleção da droga de forma periódica e prévia.

A diferença significativa ($P < 0,01$) da análise estatística referente à resistência de microorganismos patogênicos à glândula mamária frente às drogas usadas, comprovam e evidenciam mais uma vez a importância do exame bacteriológico e antibiogramas no intuito de obter uma rápida recuperação da mama e evitar o desenvolvimento de novas cepas resistentes.

Resultados desta e de outras pesquisas comprovam que o *Staphylococcus aureus* é o mais importante agente da mastite, pois, ao comparar-se com mastite por *Streptococcus* sp., tem demonstrado notável resistência e capacidade de adaptação para várias drogas antibacterianas, especialmente às penicilinas. Com relação às bactérias gram negativas, HUBER (15) observou que especialmente as da família *Enterobacteriaceae*, são representantes de um grupo de microorganismos de difícil tratamento durante os processos infecciosos da mastite bovina. São bactérias, cuja presença nas glândulas mamárias tem incrementado nos últimos anos e apresentam habilidade em desenvolver rapidamente resistência a drogas antibacterianas.

Uma vez compreendendo-se o mecanismo da capacidade que o *Staphylococcus aureus* e as bactérias gram negativas possuem para desenvolver resistência aos antibióticos, entende-se porque são encontrados resultados tão diferentes pelos autores anteriormente mencionados. Os resultados constantes nas Tabelas 1, 2 e 3, comparados com os encontrados por outros pesquisadores, vêm corroborar na preocupação em torno do uso indiscriminado dos antibióticos, fator que indica haver urgente necessidade de ser desenvolvido um trabalho de conscientização a nível de campo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANALDE, A.A.; MARTINS, L.F.; ZIEGLER, J.C. Ocorrência de estafilococcus coagulase positiva no leite gru da bacia leiteira de Pelotas, RS. *Rev. Centro Ci. Rurais*, 4(2):155-8, 1974.
2. ARDA, M. & ISTANBULLUOGLU, E. The studies on isolation and identification of aerobic and anaerobic bacteria, mycoplasma and fungi, and determination of the most effective antibiotics and fungicides against these microorganisms. *Veteriner Fakültesi Dersigy Ankara Üniversitese*, 26:14-29, 1979.
3. BATH, D.L.; DICKINSON, F.N.; TUCKER, H.A.; APPELMAN, R. D. *Dairy cattle: principles, practices, problems, profits*. 2.ed., Philadelphia, Lea & Febiger, 1978. 574p.
4. BIER, O. *Bacteriologia e Imunologia*. 17.ed. São Paulo, Melhoramentos, 1976. 1076p.
5. BLOSSER, T.H. Economic losses from and the National Research Program on mastitis in the United States. *Journal of Dairy Science*, 62(1):119-27, 1979.
6. CARTER, G.R. *Procedimentos de diagnóstico en bacteriología y micología veterinarias*. Zaragoza, Acribia, 1969. 331p.
7. DOBBINS, C.N. Mastitis losses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(10):1129-32, 1977.
8. FAGLIARI, J.J.; LUCAS, A. de; FERREIRA NETO, J.M. Sensibilidade a drogas antimicrobianas de bactérias isoladas de vacas com mastite. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 35(4):471-8, 1983.
9. FERREIRO, L.; SANTOS, E.C. dos; SILVA, N.da. Ocorrência e etiologia da mastite bovina "Zona da Mata", do Estado de Minas Gerais. *Arquivos da Escola Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, 33(1):31-7, 1981.
10. GIRAUDO, J.A. & TAMAGNINI, A.A. Diagnóstico y tratamiento de mastitis subclínica: antibioticoterapia ao secado. *Gaceta Veterinaria*, 40(328):99-105, 1978.
11. GIRAUDO, J.A. & TAMAGNINI, A.A. Mastitis, evaluacion de un programa de control en un establecimiento lechero. *Gaceta Veterinaria*, 41(342):412-9, 1979.
12. GRUNERT, E. & WEIGT, U. Euterkrankheiten. In: AHLERS, D.; ANDRESEN, P.; FRERKING, H.; GLASSER, H.; GRUNERT, E.; KRAUSE, D.; LOTTHAMMER, H.; MERKT, H.; ROSENBERGER, G.; SCHULTE, B.; WEIGT, U. *Buiatrik*. 3.ed. Hannover M. & H. Schaper, 1979. v.1, p.117-75.
13. HEIDRICH, H.J. & RENK, W. Enfermedades de las glándulas mamarias en los animales domésticos. Barcelona, Labor, 1969. 503p.
14. HOPKIRK, C.S.M. Prevention of mastitis in cows. *New Zealand Veterinary Journal*, 20(4):43-6, 1972.
15. HUBER, W.G. Antibacterial drug effectiveness against mastitis pathogens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(10):1182-4, 1977.
16. IBRAHIM, A.E. & HABIBALLA, N. Persistent mastitis in a dairy cows' breeding centre. *Journal of the Egyptian Veterinary Medical Association*, 36(1):187-93, 1976.

17. JANZEN, J.J. Economic losses resulting from mastitis. A review. *Journal of Dairy Science*, 53(9):1151-61, 1970.
18. KIMBALL, D.R. Public health regulations in milk quality control. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(10): 1212-3, 1977.
19. LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; LENGENEGGER, C.H.; CASTRO, R.P. de. Estudo da incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 5(90):437-40, 1970.
20. LANGENEGGER, J.; COELHO, N.M.; MARQUES, L.M.Q. Avaliação de eficiência de medicamentos convencionais no tratamento da mastite bovina em regiões sem recursos para o etiológico. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 8:49-52, 1973.
21. McDONALD, J.S. Bovine mastitis: Introductory remarks. *Journal of Dairy Science*, 62(1):117-8, 1979.
22. PIANA, C. & FALLAVENA, L.C.B. Mastite bovina: Comportamento do *Staphylococcus aureus* frente a antibióticos usados em regiões do Estado do Rio Grande do Sul. *Boletim do Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor"*, 7:67-72, 1980.
23. STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and procedures of statistics: A biometrical approach*. 2.ed. New York, McGraw Hill Book. 1980. 633p.
24. TOLLE, A. Die subklinische Kokkenmastitis de Rindes. *Zentralblatt fflr Veterinärmedizin. Reihe B*, 29:329-58, 1982.
25. VERMA, T.N.; MANDAL, L.N.; SINHA, B.K. Studies on subclinical mastitis with special reference to bacterial correlation and its public health importance. *Indian Journal of Public Health*, 22(3): 249-53, 1978.
26. WEIBLEN, R. & SPAHR, S.L. Determinação da persistência de penicilina no leite através de ensaio rádio-imunológico ("Charm Test"). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2(4):133-7, 1982.
27. WEIGT, U. Mastitis: Un problema de rodeo. In: JORNADAS URUGUAYAS DE BUIATRIA. 7, Paysandú, 1979. *Seminário*. Paysandú, 1979, 01-15.