

## PERFIL DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE AGENTES CONTAGIOSOS E AMBIENTAIS ISOLADOS DE MASTITE CLÍNICA E SUBCLÍNICA DE BÚFALAS

**A.P. Cunha<sup>1</sup>, L.B.G. da Silva<sup>2</sup>, J.W. Pinheiro Júnior<sup>1</sup>, D.R. da Silva<sup>1</sup>,  
A.A. da F. Oliveira<sup>3</sup>, K.P.C. da Silva<sup>1</sup>, R.A. Mota<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, R. Dom Manoel de Medeiros, s/nº, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: jrwilton@pop.com.br

### RESUMO

Com o objetivo de estudar a frequência de agentes bacterianos envolvidos nos processos inflamatórios clínicos e subclínicos da glândula mamária de búfalas e realizar o perfil de sensibilidade dos agentes isolados, foram estudadas 128 búfalas em lactação, totalizando 512 quartos mamários. Realizou-se o "California Mastitis Test" para diagnóstico da frequência de casos subclínicos e o exame físico da glândula mamária e teste da caneca telada para identificar os casos clínicos. As amostras de leite foram colhidas dos quartos que apresentaram reação ao C.M.T. (escores 1+, 2+, 3+) e daqueles com mastite clínica, sendo posteriormente realizados os exames microbiológicos para a identificação dos agentes envolvidos, além dos testes de sensibilidade a antimicrobianos. Observaram-se bactérias isoladas e associações destas em casos clínicos e subclínicos da doença, destacando-se o *Staphylococcus coagulase negativa* como o mais freqüente. Os testes de sensibilidade *in vitro* demonstraram maior eficácia para os antibióticos gentamicina (97,98%), florfenicol (93,94%) e enrofloxacin (90,90%). A gentamicina apresentou 100% de eficácia no tratamento dos casos clínicos, sendo considerada uma boa opção para o controle da doença no rebanho estudado.

**PALAVRAS-CHAVE:** Eficiência de antibióticos, agentes etiológicos, bubalinocultura.

### ABSTRACT

ANTIMICROBIALS SENSITIVITY PROFILE OF CONTAGIOUS AND AMBIENT AGENTS ISOLATED OF CLINICAL AND SUBCLINICAL MASTITIS OF BUFFALOS. With the objective of examining the frequency of bacterial agents involved in the clinical and subclinical inflammatory processes of the mammary glands of buffalos and to study the sensitivity profile of the isolated agents 128 lactating buffalos (a total of 512 mammary quarters) were examined. The "California Mastitis Test" was the method used for the diagnosis of frequency of subclinical cases and physical examination of the udder and a screened mug test for identification of the clinical cases. Samples of milk were collected from the quarters that showed a reaction to CMT (scores 1+, 2+, 3+) and from those with clinical mastitis. All samples were previously microbiologically tested for the identification of the agents involved together with the sensitivity tests and antimicrobials. The results indicated that the bacteria isolated and associated in the clinical and subclinical cases of the disease were mainly *Staphylococcus coagulase negative*. The *in vitro* sensitivity tests showed greater efficacy for gentamicin antibiotics (97.98%), florfenicol (93.94%) and enrofloxacin (90.90%). Gentamicin showed 100% efficacy in the treatment of the clinical cases and was considered the best treatment for the control of the disease in the herd in this study.

**KEY WORDS:** Efficacy of antibiotics, etiological agents, raising buffalos.

### INTRODUÇÃO

A maior exploração leiteira de bubalinos encontra-se na Índia e Paquistão, onde quase toda proteína

de origem animal consumida pela população é proveniente do leite de búfalas. Esta espécie apresenta todas as características necessárias para uma produção de leite comercial e economicamente viável. Na

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, PE, Brasil.

<sup>3</sup>EMBRAPA Caprinos, Sobral, CE, Brasil.

Índia, já foram observadas búfalas produzindo até 31 kg de leite/dia e no Brasil não é incomum búfalas produzirem por volta de 22 kg de leite/dia (SAMARA *et al.*, 1993). Em comparação com o leite de vaca, o leite de búfala contém 30% a mais de proteína e apresenta níveis de colesterol mais baixos (FONSECA, 1987).

A mastite representa um sério problema para a produção leiteira, determinando relevantes perdas econômicas devido à redução na produção de leite, custos do leite descartado e gastos com tratamentos (HAMZA & CHOUDHURI, 1994).

PARANIAPE & DAS (1986) verificaram que os microrganismos mais frequentemente isolados na mastite bubalina são *Streptococcus* spp. (29,7%), *Staphylococcus* spp. (10,39%), *Bacillus* spp. (5,94%), *Escherichia coli* (4,45%), além das infecções bacterianas mistas (25,24%). CHANDER & BAXI (1975) relataram a presença do *Staphylococcus* spp. em 46,2% dos casos, seguido pelo *Streptococcus* spp. (32,41%), *Escherichia coli* (7,41%) e *Corynebacterium* spp. (0,93%). Em outro estudo, MUHAMMAD *et al.* (1997) classificaram 53,9% dos isolados como sendo *Staphylococcus* spp.

Segundo MENDONÇA *et al.* (1999), as mastites podem ser classificadas quanto a forma de transmissão, em primária (contagiosa) e secundária (ambiental), e quanto a forma de apresentação, em clínica e subclínica. De acordo com Nascimento e Carvalho (1993), a higiene é cuidado imprescindível na exploração leiteira de búfalos, pois estes animais têm predileção por terrenos alagadiços.

O California Mastitis Test (C.M.T), idealizado por SCHALM & NOORLANDER (1957), é capaz de detectar o processo inflamatório na glândula mamária, sendo aceito internacionalmente para o diagnóstico da mastite subclínica a campo (COSTA *et al.*, 1996). Os autores, no entanto, relataram a conveniência de testes microbiológicos periódicos para a orientação terapêutica desta afecção, principalmente quando apoiada aos testes *in vitro* de sensibilidade microbiana.

A indústria leiteira mundial atravessa um período de intensas transformações em sua estrutura e podem ser identificadas como grandes tendências a diminuição dos preços pagos ao produtor, a redução de subsídios, o aumento do módulo de produção e, principalmente, o aumento nas exigências da qualidade do leite, assim como uma maior preocupação dos consumidores com relação à segurança alimentar. Particularmente, no que diz respeito à qualidade do leite, a questão relativa ao pagamento diferenciado da matéria-prima, em função de suas características físicas, químicas, bromatológicas e organolépticas, tende a ampliar-se e, dessa forma, o pagamento baseado na qualidade vai ser um elemento de diferenciação dos sistemas de produção, ditando a permanência ou não dos produtores na atividade (FONSECA & SANTOS, 2000).

Considerando a importância da mastite para a espécie bubalina, objetivou-se com este trabalho estudar a frequência dos agentes etiológicos envolvidos e realizar o perfil de sensibilidade das bactérias isoladas frente à antimicrobianos de uso em medicina veterinária.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 128 búfalas leiteiras da raça Murrah e seus mestiços, em diferentes estágios de lactação, com uma produção média de 7 L de leite/animal/dia, em duas ordenhas. Os animais eram mantidos exclusivamente em pastagem cultivada e provenientes de uma propriedade leiteira industrial, localizada no Município de Taipu, Estado do Rio Grande do Norte. As búfalas eram ordenhadas mecanicamente com os cuidados necessários na linha de ordenha, além da realização do pré e pós *dipping* com compostos a base de iodo.

Com os animais na linha de ordenha, procedeu-se o exame físico do úbere através de inspeção e palpação; em seguida, este foi lavado com água e sabão e enxugado com papel toalha, sendo os primeiros jatos de leite utilizados no teste da caneca telada para detecção de mastite clínica. Em seguida, realizou-se o California Mastitis Test (C.M.T.) para o estudo da frequência dos casos de mastites subclínicas (escores 1+, 2+, 3+), segundo SCHALM & NOORLANDER (1957). As amostras foram colhidas dos quartos que apresentaram mastite clínica ou subclínica, após prévia anti-sepsia do óstio do teto com álcool a 70°GL, obtendo-se um volume de aproximadamente 10 mL de leite em tubos estéreis com tampas rosqueáveis e devidamente identificados.

As amostras de leite foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo gelo reciclável e encaminhadas ao laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco para realização das análises microbiológicas e dos testes de sensibilidade a antimicrobianos. No laboratório, alíquotas de 50 µL de leite foram semeadas em ágar base enriquecido com 5% de sangue ovino e ágar Levine e incubadas em estufa bacteriológica a 37° C, realizando-se leituras após 24 e 48h, sendo observadas as características de crescimento e produção de hemólise. As colônias isoladas foram submetidas à prova de catalase e analisadas quanto às características morfotintoriais através da técnica de Gram.

As enterobactérias foram classificadas utilizando-se as provas bioquímicas de citrato, lisina, ágar triplice ferro açúcar (TSI), vermelho de metila (VM), Voges Proskauer (VP), indol, urease, motilidade e fermentação de açúcares (glucose, frutose, galactose, manose, lactose, sacarose, maltose, manitol e sorbitol), de acordo com CARTER (1984).

Para a diferenciação dos *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, utilizou-se o teste de coagulase, de acordo com KONEMAN (2001).

Após a identificação, as 99 amostras bacterianas foram cultivadas em caldo infuso de cérebro e coração, incubadas por 24 a 48h a 37° C e, posteriormente, semeadas em ágar Mueller Hinton para a realização dos antibiogramas, através do método simples em disco, segundo técnica descrita por CARTER (1984). Foram utilizados os seguintes antibióticos: gentamicina (10 µg), florfenicol (30 µg), enrofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), cefalexina (30 µg), sulfam (1,25 µg) + trimetoprim (23,7 µg), penicilina (10 µg) e tetraciclina (30 µg), a interpretação foi realizada através da medição dos halos de inibição, de acordo com o fabricante dos discos de antibióticos.

Os resultados obtidos foram analisados, utilizando-se análise descritiva de cálculo de frequências absoluta e relativa para os diferentes parâmetros estudados (SAMPAIO, 1998).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 128 animais estudados, sete (5,47%) apresentaram mastite clínica, com 14 (2,73%) quartos acometidos. Ao C.M.T. foram detectados 53 (41,41%) animais com mastite subclínica, totalizando 103 (20,12%) quartos afetados com graus variados. Os resultados obtidos neste estudo estão de acordo com as citações feitas por CHANDER & BAXI (1975) que encontraram índice de 35,44% para animais com mastite subclínica, diferenciando de SAINI *et al.* (1992) que relataram

2,59% de quartos mamários de búfalas com mastite subclínica. No entanto, KAPUR *et al.* (1992) observaram índices mais elevados de mastite subclínica, com 36,67% dos quartos afetados. Segundo MENDONÇA *et al.* (1999) fatores relacionados à nutrição, manejo, higiene e condições ambientais, aliados às características genéticas, influenciam os índices de mastite no rebanho.

Os agentes isolados do leite de búfalas com mastite clínica e subclínica encontram-se na Tabela 1.

De acordo com CHANDER & BAXI (1975) as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* são as principais causas infecciosas de mastite bubalina.

A bactéria mais prevalente nos casos de mastite clínica e subclínica das búfalas no rebanho estudado foi o *Staphylococcus* spp., onde 20% das amostras foram coagulase positiva. Os achados deste estudo corroboram com os de KAPUR *et al.* (1992) e MUHAMMAD *et al.* (1997) que afirmaram ser este o agente mais frequentemente isolado nas mastites contagiosas, transmitidas quase que exclusivamente durante a ordenha, representando grande importância epidemiológica nas mastites bubalinas. Porém, KAPUR & SINGH (1978) observaram maior incidência do *Streptococcus* spp. no leite de búfalas com mastite. A frequência de *Streptococcus* spp., neste estudo, foi de 25,00% nos casos clínicos e de 13,58% nos casos subclínicos, corroborando com os resultados obtidos por PARANJAPE & DAS (1986). Os resultados sobre os demais agentes envolvidos neste estudo são concordantes com aqueles relatados por CHANDER & BAXI (1975), indicando similaridade na etiologia desta doença em diferentes regiões ao longo do tempo.

Tabela 1 - Frequência absoluta (FA) e relativa (FR) dos agentes isolados ou em associação em casos de mastite clínica e subclínica de búfalas.

Agentes isolados	Mastite clínica		Mastite subclínica	
	FA	FR (%)	FA	FR (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	4	33,34	41	50,62
<i>Streptococcus</i> spp.	3	25,00	11	13,58
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Streptococcus</i> spp.	2	16,67	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	1	8,33	6	7,41
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	8,33	11	13,58
<i>Escherichia coli</i>	1	8,33	2	2,47
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	2	2,47
<i>Staphylococcus</i> spp. + <i>Micrococcus</i> sp.	-	-	2	2,47
<i>Streptococcus</i> spp. + <i>Corynebacterium</i> spp.	-	-	2	2,47
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	2	2,47
<i>Micrococcus</i> sp.	-	-	1	1,23
<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	1	1,23
Total	12	100	81	100

Das amostras de leite procedentes dos animais com mastite clínica 12 (85,71%) apresentaram-se positivas ao exame microbiológico e duas (14,29%) foram negativas, enquanto que, das 103 amostras com mastite subclínica 81 (78,64%) foram positivas ao exame microbiológico e 22 (21,36%) negativas (Tabela 2). Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por KAPUR *et al.* (1992) que observaram 73,96% de amostras de leite de búfalas com mastite, clínica ou subclínica, positivas em culturas. CHANDER & BAXI (1975) relataram apenas 35,44% de exames bacteriológicos positivos em amostras de leite de búfalas com mastite subclínica.

Quanto a relação do número de animais e quartos afetados por mastite subclínica observou-se que 25 (47,17%) búfalas apresentaram um quarto positivo ao C.M.T., 12 (22,64%) 2 quartos, 10 (18,87%) 3 quartos e 6 (11,32%) os 4 quartos positivos. CHANDER & BERHA (1995) também relataram que a maioria das infecções ocorre em apenas um quarto da glândula mamária, como observado neste estudo. Segundo RADOSITIS *et al.* (2002), os mecanismos de defesa local dificultam a instalação da infecção, porém quando estes são afetados a glândula torna-se vulnerável e constitui o reservatório e fonte de transmissão da mastite; além disso, técnicas deficientes de limpeza do teto e úbere podem permitir a disseminação dos microrganismos para outros quartos da mesma vaca e propiciar a contaminação das unidades de ordenha que são transferidas de um animal ao outro.

De acordo com COSTA *et al.* (1996), o C.M.T. é um método auxiliar de boa correlação com o exame

microbiológico, porém o processo inflamatório pode não ser de origem infecciosa. Por outro lado, segundo esses autores, animais portadores de mastite infecciosa, dependendo do estágio, podem não apresentar reações positivas nos testes que detectam a presença de processo inflamatório e que são positivos ao exame microbiológico, revelando uma importante fonte de infecção, principalmente em relação à mastite contagiosa.

Na avaliação dos perfis de sensibilidade *in vitro*, com diferentes antibióticos de utilização em medicina veterinária frente as amostras bacterianas isoladas de mastite bubalina, a gentamicina foi o antibiótico que demonstrou o maior percentual de eficácia (97,98%) (Tabela 3), corroborando com PARANJAPE & DAS (1986) que relataram a efetiva ação deste antimicrobiano frente aos agentes causadores de mastite nesta espécie. Esta é uma informação importante no âmbito técnico, principalmente para profissionais que atuam a campo e que não dispõem de estrutura para procedimentos laboratoriais.

Outro aspecto importante a ser considerado neste estudo foi o elevado percentual de bactérias sensíveis ao florfenicol e à enrofloxacina, fazendo destes uma opção de tratamento sistêmico associado ao uso intramamário da gentamicina.

A penicilina e a tetraciclina foram as drogas que apresentaram a menor eficácia *in vitro* (65,66%) e (58,58%), respectivamente (Tabela 3). BABU *et al.* (1979) encontraram índices semelhantes quanto à penicilina, porém observaram maior sensibilidade quanto à tetraciclina.

Tabela 2 - Resultados obtidos nos exames microbiológicos de amostras de leite de búfalas com mastite clínica e subclínica por escore de C.M.T.

Exame microbiológico	Mastite clínica	Mastite subclínica		
		1+	2+	3+
Positivo	12 (85,71%)	8 (38,10%)	40 (85,11%)	33 (94,29%)
Negativo	2 (14,29%)	13 (61,90%)	7 (14,89%)	2 (5,71%)
Total	14 (100,00%)	21 (100,00%)	47 (100,00%)	35 (100,00%)

Tabela 3 - Resultado dos testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de bactérias isoladas do leite de búfalas com mastite clínica e subclínica.

Antibióticos testados	Nº de amostras testadas	Nº de amostras resistentes ou intermediárias	Percentual de amostras sensíveis
Gentamicina	99	2	97,98
Florfenicol	99	6	93,94
Enrofloxacina	99	9	90,90
Norfloxacina	99	12	87,88
Cefalexina	99	12	87,88
Sulfa + Trimetoprim	99	22	77,78
Penicilina	99	34	65,66
Tetraciclina	99	41	58,58

Tais drogas foram amplamente empregadas no passado. O uso incorreto associado à seleção natural dos microorganismos desafiados, provavelmente, resultou no fenômeno de resistência. Segundo MENG *et al.* (1998), a resistência às drogas está relacionada, principalmente, com o uso excessivo de antibióticos em medicina veterinária e às aplicações sub-terapêuticas de antimicrobianos para a prevenção de doenças, para a promoção do crescimento e eficiência alimentar em animais de produção.

## CONCLUSÃO

Observou-se neste estudo que os agentes classificados como contagiosos são os principais responsáveis pela mastite bubalina e que quando da indisponibilidade de realização da lactocultura e antibiograma, a gentamicina pode ser o antibiótico de eleição para o tratamento e controle das mastites clínica e subclínica nos rebanhos.

## REFERÊNCIAS

- BABU, T.S.; PARGAONKAR, V.N.; MURTHY, K.G. Study of antibiotic sensitivity pattern of mastitis milk. *Indian Veterinary Journal*, v.56, p.211-213, 1979.
- CARTER, G.R. *Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária*. São Paulo: Roca, 1984. 515p.
- CHANDER, S. & BAXI, K.K. A note on diagnosis and treatment of subclinical mastitis in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v.52, n.11, p.847-849, 1975.
- CHAND, P. & BEHRA, G.D. Factors influencing occurrence of mastitis genetic and environmental factors. *Indian Journal of Dairy Science*, v.48, n.4, p.271-273, 1995.
- COSTA, E.O.; MELVILLE, P.A.; RIBEIRO, A.R.; VIANI, F.C.; MASCOLLI, R.; OLIVEIRA, P.J. Mastite bovina: CMT versus microbiológico. *Hora Veterinária*, v.15, n.89, p.53-54, 1996.
- FONSECA, W. *Búfalo: estudo e comportamento*. São Paulo: Ícone, 1987. 405p.
- FONSECA, L.F.L. & SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
- KAPUR, M.P. & SINGH, R.P. Studies on clinical cases of mastitis in cows, buffaloes and goats in Haryana State. *Indian Veterinary Journal*, v.55, p.803-806, 1978.
- KAPUR, M.P.; ANSHUSHARMA, R.; BHARDWAL, R.M. Bacteriology of clinical mastitis in buffaloes. *Buffalo Bulletin*, v.11, n.2, p. 42-47, 1992.
- KONEMAN, E.N.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JUNIOR, N.C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Médici, 2001. 1465p.
- MENG, J.; ZHAO, S.; DOYLE, M.P.; JOSEPH, S.W. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *Journal of Food Protection*, v.61, n.11, p. 1511-1514, 1998.
- MENDONÇA, C.L.; FIORAVANT, M.C.S.; SILVA, J.A.B.A. Etiologia da mastite bovina. *Veterinária Notícias*, v.5, n.1, p.107-118, 1999.
- MUHAMMAD, G.; LODHI, L.A.; ATHAR, M.; REHMAN, F. Evaluation of cephalexin in the treatment of clinical mastitis in buffalo. *Indian Journal of Dairy Science*, n.50, v.3, p.205-208, 1997.
- NASCIMENTO, C.N.B. & CARVALHO, L.O.M. *Criação de búfalos: alimentação, manejo, melhoramento e instalações*. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1993. 403p.
- PARANJAPE, V.L. & DAS, A.M. Mastitis among buffalo population of Bombay: a bacteriological report. *Indian Veterinary Journal*, n.63, v.6, p.438-441, 1986.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HICHLIFF, K.W. Mastite. In: *Clínica veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, Cap.15, p.541-629.
- SAMARA, S.I.; DUTRA, I.S.; FRANCESCHINI, P.H.; MOLERO FILHO, J.R.; CHACUR, M.G.M. *Sanidade e produtividade em búfalos*. Jaboticabal: Funep-UNESP, 1993. 203p.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 185p.
- SCHALM, O.W. & NOORLANDER, D.O. Experimental and observation lading to development of California Mastitis Test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.139, p.199-204, 1957.

Recebido em 8/11/05

Aceito em 29/12/05